

**Untersuchungen zum genetischen Potential der Sekundärstoffbildung
von
Sorangium cellulosum So ce90 und Identifizierung des
Spirangienbiosyntheseegenclusters.**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Dipl.-Biol. Jens Michael Knauber
aus Ludwigshafen

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

2. Referent: Prof. Dr. Rolf Müller (Saarbrücken)

eingereicht am: 29.07.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.12.2004

Braunschweig, 2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Knauber, J., Gebhard, F., Müller, R. & Beyer S.: The genome of *Sorangium cellulosum* as source for pharmaceuticals and other biologically active substances. (Poster) Workshop der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) "Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten", Bonn (2000).

Knauber, J., Müller, R., Blöcker, H., Nordsiek, G. & Beyer, S.: Identification of the spirangien biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum* So ce90. (Poster) Workshop der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) "Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten", Berlin (2001).

Knauber, J., Nordsiek, G., Blöcker, H. & Beyer, S.: Module duplications as startegy behind the evolution of polyketide synthases- The spirangiene synthase from *Sorangium cellulosum* So ce90. (Vortrag) Workshop der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) "Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten", Freiburg (2002).

„Es ist nicht genug zu wissen, man muß es auch anwenden“

(Johann Wolfgang von Goethe)

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit ist an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig in der Arbeitsgruppe „Molekularbiologie der Myxobakterien“ (MX) entstanden.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn für die Übernahme des Erstreferates zur Durchführung der Promotion an der TU-Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich herzlich für die Übernahme des Co-Referates, sowie für die beständigen Anregungen und aufschlussreichen Diskussionen.

Herrn Dr. Beyer danke ich für das fortwährende Interesse am Fortgang der Arbeit und die vielen fruchtbaren Diskussionen und Kommentare zur Arbeit.

Herrn Dr. Gerth und Frau Diana Telkemeyer danke ich für die Hilfe bei der Herstellung von Kulturextrakten, für die Benutzung der HPLC und nicht unerhebliche Mengen an Ethylacetat.

Herrn Dr. Steinmetz aus der Abt. von Prof. Höfle danke ich für die Isolierung und Strukturaufklärung der Spirangiene und deren Derivate.

Mein Dank gilt auch den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe MX für gute Zusammenarbeit und gesellige Abende.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Großvater für die fortwährende Unterstützung und gutes Essen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myxobakterien	1
1.2	Myxobakterien als Naturstoffproduzenten	2
1.3	Biochemie von Polyketidsynthasen	5
1.4	Genetik von Polyketidsynthasen	9
1.5	Biochemie und Genetik von Polypeptidsynthetasen	10
1.6	Genetik ausgewählter Biosynthesen aus Myxobakterien	11
1.7	Regulation von Sekundärstoffbiosyntheseegenen	13
1.8	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce90	15
1.8.1	Epothilone	15
1.8.2	Biochemie und Genetik der Epothilonbildung	16
1.8.3	Spirangiene	17
1.9	Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien und Enzyme	20
2.2	Medien und Lösungen	21
2.2.1	Nährmedien	21
2.2.2	weitere Lösungen:	24
2.2.3	Antibiotika	25
2.2.4	Zellzahlbestimmung	25
2.3	Bakterien und Plasmide	25

2.4	Oligonukleotide	28
2.5	Anzucht und Lagerung von Bakterien	30
2.5.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	30
2.5.2	Anzucht und Fermentation von <i>S. cellulorum</i> So ce90	30
2.6	Isolierung von Nukleinsäuren	32
2.7	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	33
2.8	Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	33
2.9	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	34
2.10	Klonierung von Inaktivierungsplasmiden	34
2.10.1	Klonierung von pJK10	34
2.10.2	Klonierung des Plasmides pJKB16	34
2.10.3	Klonierung des Plasmides pJKB19	35
2.10.4	Klonierung des Plasmides pSUPHyg und weiterer Inaktivierungsplasmide	35
2.11	Nicht radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	36
2.12	DNA-Hybridisierungen an immobilisierter DNA und Detektion der markierten DNA-Sonden	36
2.13	Antibiotikatest gegen Myxobakterien	38
2.13.1	Test in Flüssigmedium	38
2.13.2	Test auf Agarplatten	39
2.14	Transformation von Bakterien	39
2.14.1	Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.14.2	Transformation von <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	41
2.14.3	Triparentale Konjugation von <i>Sorangium cellulosum</i> So ce90	41
2.15	Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
2.16	Herstellung von Kulturextrakten	44

2.17	HPLC	44
2.18	Massenspektrometrie und NMR	45
2.19	Sequenzierung von DNA	46
2.20	Verwendete Computerprogramme	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Cosmidgenombibliothek von <i>S. cellulosum</i> So ce90	47
3.2	Screening der Cosmidgenombibliothek von <i>S. cellulosum</i> So ce90	48
3.3	Genlocus A2	51
3.3.1	Analyse der A2 DNA-Sequenz und Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz	51
3.3.2	Sequenzwiederholungen im Gencluster A2	53
3.4	Genlocus A5	54
3.4.1	Analyse der A5 DNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz	54
3.5	Genlocus Cos6	57
3.5.1	Analyse der Cos6 DNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz	57
3.5.2	Analyse des IS-Elementes	59
3.5.3	<i>S. cellulosum</i> So ce90 besitzt ein <i>zmaR</i> -orthologes Gen	60
3.6	Genlocus Cos8	62
3.6.1	Identifizierung des Genlocus' Cos 8 als Epothilonbiosynthesegencluster	62
3.6.2	Identifizierung eines zu Cos 8 benachbarten NRPS- Genclusters	62
3.7	Genlocus A7	64
3.7.1	Analyse der A7 DNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz	64
3.7.2	Analyse der ORFs 1 bis 4	66
3.7.3	Analyse von <i>spiK</i>	70
3.7.4	Analyse von <i>spiL</i>	71

3.7.5	Analyse von <i>spiZ</i>	72
3.7.6	DNA-Sequenzwiederholungen im A7-Genclusterbereich	74
3.8	Weitere Genloci codieren für PKS und NRPS	76
3.9	Entwicklung eines Geninaktivierungssystems mit neuen Selektionsmarkern	76
3.9.1	Untersuchungen zur Antibiotika-Resistenz in <i>S. cellulosum</i> So ce90 und <i>St. aurantiaca</i> DW 4/3-1	76
3.9.2	Resistenzvermittlung von pJKB10 in <i>E. coli</i> und <i>St. aurantiaca</i> DW 4/SB1	78
3.9.3	Triparentale Konjugation von <i>S. cellulosum</i> So ce90	80
3.10	Funktionelle Analyse und Charakterisierung des A7-Genlocus	80
3.10.1	<i>spiH</i> ist an der Spirangienbiosynthese beteiligt	80
3.10.2	Versuche der Inaktivierung von <i>spiK</i>	83
3.10.3	SpiL ist eine Monooxygenase	83
3.10.4	SpiZ ist ein Regulator der Spirangienbiosynthese	87
3.10.5	Funktionelle Analyse und Charakterisierung von EpoF	90
4	Diskussion	94
	Zusammenfassung	120
5	Literatur	122
6	Anhang	144

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AD	Adenylierungsdomäne
AA	Aminosäure(n)
AT	Acyl-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection, Maryland
Ausg.	Ausgabe
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Bp	Basenpaare
Cd	Kondensationsdomäne
Cy	Zyclisierungsdomäne
DH	Deydrogenasedomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleintriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
ECF	Extracytoplasmic function
ER	Enoylreduktase
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
kDa	Kilodalton
KR	β -Ketoacyl-Reduktase
KS	β -Ketoacyl-Synthase
<i>M.</i>	<i>Myxococcus</i>
Me	Methyl-
MW	Molekulargewicht
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
nt	Nukleotid(e)
O.D.	Optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
Ox	Oxidationsdomäne

<i>p</i>	Promotor
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pers.	persönliche
PKS	Polyketidsynthase
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
<i>S.</i>	Sorangium
<i>St.</i>	<i>Stigmatella</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TE	Thioesterase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
ÜK	Übernachtskultur
Ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ausgewählte Strukturen myxobakterieller Sekundärstoffe	3
Abb. 2: Anteil und Verteilung isolierter Naturstoffe aus Myxobakteriengattungen in % der Gesamtisolate	4
Abb. 3: Chemie der Biosynthese von Polyketiden an Domänen von Polyketidsynthasen.	8
Abb. 4: Strukturen der Spirangiene A-D	18
Abb. 5: Genlocus A2 mit möglichen ORFs.	52
Abb. 6: Genlocus A5 mit möglichen ORFs.	54
Abb. 7: Genlocus Cos 6 mit möglichen ORFs	57
Abb. 8: Analyse des ORF 7 im Genlocus Cos6.	59
Abb. 9: BLAST- Vergleich der Proteinsequenz von ORF 3 mit ZmaR.	61
Abb. 10: Relative Lage der überlappenden Cosmide des Bereichs von Cosmid 91	64
Abb. 11: Genlocus A7 mit möglichen ORFs und Lage der Cosmide A6 und A7.	65
Abb. 12: Modulaufbau des <i>spi</i>- Genclusters und Anordnung der Gene für modifizierende Enzyme sowie des Regulatorgens <i>spiZ</i>.	67
Abb. 13: Sequenzvergleich der Substratspezifität der AT-Domänen des A7-Genlocus.	70
Abb. 14: Vergleich von SpiK und McyJ.	71
Abb. 15: BLAST- Vergleich von SpiL mit einer Cytochrom P-450 Monooxygenase.	72
Abb. 16: Vergleich von SpiZ mit CarQ und SigX.	73
Abb. 17: Position von DNA-Sequenzwiederholungen im <i>spi</i>-Gencluster.	75
Abb. 18: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB16 über homologe Rekombination im Genort <i>spiH</i>.	81
Abb. 19: Hybridisierung gegen genomische DNA von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und der Mutante <i>S. cellulosum</i> So ce90JKB16 zu Nachweis der Integration von pJKB16.	82
Abb. 20: HPLC- Chromatogramme der Kulturextrakte von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und der Mutante JKB16.	83
Abb. 21: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB29 durch homologe Rekombination im Genort <i>spiL</i>.	84

Abb. 22: Hybridisierung genomischer DNA von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und der Mutante <i>S. cellulosum</i> So ce90 JKB19I..	85
Abb. 23: HPLC-Chromatogramme der Kulturextrakte von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und der Mutante JKB19I.	86
Abb. 24: Strukturen isolierter Komponenten der Mutante <i>S. cellulosum</i> So ce90 JKB19.	87
Abb. 25: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB30 durch homologe Rekombination im Genort <i>spiZ</i> .	88
Abb. 26: Hybridisierung genomischer DNA von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und der Mutante <i>S. cellulosum</i> So ce90 JKB15I..	89
Abb. 27: HPLC-Chromatogramme der Kulturextrakte von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und der Mutante JKB19I.	90
Abb. 28: HPLC-Chromatogramme der Kulturextrakte von <i>S. cellulosum</i> So ce90B2 und der Mutante JKB14.	91
Abb. 29: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB19 im Genort <i>epoF</i> .	92
Abb. 30: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate zur genomischen DNA-Analyse der <i>epoF</i> -Transkonjuganten <i>S. cellulosum</i> So ce90JKB12 und JKB14.	93
Abb. 31: Ergebnis der Gruppierung der Cosmidgenombibliothek von <i>S. cellulosum</i> So ce90.	96
Abb. 32: Hypothetischer Aufbau der Spirangiensynthase und mögliche Spirangienbiosynthese.	106
Abb. 33: Struktur von Spirangien A und des isolierten SpirangienX und Spekulation zur Spiroketalbildung des Avermectins.	110
Abb. 34: Aminosäuresequenz und konservierte Regionen von SpiZ	112
Abb. 35: Mögliche Evolution der Spirangiensynthase durch Genduplikation	116
Abb. 36: Mögliche produzierte Spirangiene des durch Duplikation entstandenen Spirangienbiosynthesegenclusters.	117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Epothilonbiosynthesegenclusters	16
Tab. 2: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Enzyme	20
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	26
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Plasmide	26
Tab. 5: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide	27
Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	29
Tab. 7: Verwendete DIG-markierte DNA-Fragmente für Hybridisierungen	37
Tab. 8: Standardprotokoll für PCR	43
Tab. 9: Gruppenbezeichnung und repräsentative Cosmide aus der Cosmidgenombibliothek von <i>S. cellulosum</i> So ce90	49
Tab. 10: Cosmidgruppen und überlappende Cosmide aus der Cosmidgenombibliothek von <i>S. cellulosum</i> So ce90	50
Tab. 11: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus A2	53
Tab. 12: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus A5	55
Tab. 13: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus Cos6	58
Tab. 14: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus A7	65
Tab. 15: Spirangiensynthesemodule, abgeleitet aus den Genen <i>spiG</i> bis <i>spiJ</i>	67
Tab. 16: Analyse der Gene <i>spiK</i> , <i>spiL</i> , <i>spiZ</i> und der abgeleiteten Aminosäuresequenz	71
Tab. 17: Mögliche Promotorstrukturen vor <i>spiZ</i> im Vergleich zu bekannten σ^{70} abhängigen Promotoren	74
Tab. 18: Sequenzwiederholungen in den Genen <i>spiI</i> und <i>spiJ</i>	75
Tab. 19: Analyse des Wachstums von <i>S. cellulosum</i> So ce90 und <i>St. aurantiaca</i> DW4/3-1 in Anwesenheit von Erythromycin und Hygromycin B	78

1 Einleitung

1.1 Myxobakterien

Myxobakterien, die erstmalig von Roland Thaxter beschrieben wurden (Thaxter, 1892), sind Gram-negative, strikt aerobe und chemoorganoheterotrophe Bodenbakterien. Die durch Gleiten beweglichen, stäbchenförmigen vegetativen Bakterienzellen erreichen dabei eine durchschnittliche Größe von $0,6\mu\text{m}$ - $1,2\mu\text{m}$ x $3\mu\text{m}$ - $15\mu\text{m}$ (Reichenbach und Dworkin, 1992). Myxobakterien kommen ubiquitär vor und können aus Böden verschiedenster klimatischer Zonen, von verrottetem Holz oder aus dem Kot pflanzenfressender Säugetiere isoliert werden (Reichenbach, 1993; Reichenbach, 1999). Im Zusammenhang mit ihrem lokalen Auftreten steht die Sekretion von Enzymen, die zum Abbau verschiedener Makromoleküle dienen. Myxobakterien nutzen verschiedene Biopolymere, wie Polysaccharide und Proteine als Nährstoffquelle. Auch durch die Lyse von Bakterien und Hefen werden die für das Wachstum benötigten Nährstoffe verfügbar (Beebe, 1941; Singh, 1947; Wu et al., 1968; Burnham et al., 1981; Burnham et al., 1984).

Besonders auffallend ist bei Myxobakterien der morphologisch stark differenzierte Lebenszyklus, der ihnen das Attribut eines „quasi-sozialen“ Verhaltens (Reichenbach, 1984) eingebracht hat. Der Lebenszyklus ist dabei in zwei Phasen unterteilt. In Phase I teilen sich die vegetativen Zellen der Myxobakterienarten und bilden unter günstigen Nährstoffbedingungen einen Schwarm, der ausreichend Enzyme produziert um auch grobes organisches Material aufzuschließen. Die Myxobakterienzellen bewegen sich dabei gemeinsam in konzentrischen Kreisen (Reichenbach, 1984). Unter nährstoffarmen Bedingungen auf festen Oberflächen differenzieren sich die Zellen des Schwarmes und bilden in Phase II des Lebenszyklus sog. Fruchtkörper aus. Das Grundgerüst des Fruchtkörpers wird von Zellen gebildet, die zu einem großen Teil (bis zu 90%) lysieren (Dworkin, 2000). Die restlichen Zellen differenzieren sich zu thermotoleranten und gegen Austrocknung geschützten Myxosporen, die häufig in Sporangiolen vorliegen. Ähnlich den Pilzen befinden sich in den Sporangiolen, die vom Fruchtkörperstiel abgegrenzt sind, nur wenige Sporen. Die Sporen können unter günstigen

Nährstoffbedingungen auskeimen und eine neue Generation von vegetativen Zellen bilden. Die meist stark gefärbten, artspezifischen Fruchtkörper erreichen dabei eine Größe von 10 µm bis 1000 µm (Reichenbach, 1993).

Aufgrund der o. g. Eigenschaften, sowie mit Hilfe von 16S rRNA-Sequenzvergleichen (Stackebrandt et al., 1988; Shimkets und Woese, 1992; Spröer et al. 1999; Pradella et al., 2002) und dem hohen GC-Gehalt von 67-71 mol% (Shimkets, 1993) werden die Myxobakterien klassifiziert. Sie zählen zu dem phylogenetischen Zweig der δ -Proteobakterien (Woese et al., 1985; Stackebrandt et al., 1988) und werden in der Ordnung *Myxococcales* zusammengefasst. Diese teilt sich in zwei Unterordnungen, die *Cystobacterineae* und die *Sorangineae*. Zur ersten Unterordnung gehören Gattungen wie *Myxococcus*, *Corallococcus*, *Archangium* und *Stigmatella*. Die vegetativen Zellen sind schlank, am Ende meist spitz zulaufend und unterscheiden sich deutlich in ihrer Morphologie von den von ihnen gebildeten Myxosporen. In der zweiten Unterordnung fasst man die Gattungen *Polyangium* („*Sorangium*“), *Chondromyces* und *Nannocystis* zusammen. Die vegetativen Zellen sind eher kurze, am Ende abgerundete Stäbchen, die viel Ähnlichkeit mit den von ihnen gebildeten Sporen besitzen (Reichenbach, 1993). Nach bisherigen Untersuchungen besitzen Myxobakterien die bisher größten beschriebenen bakteriellen Genome von 9 bis über 12 Megabasen (Chen, et al., 1990; Neumann et. al., 1992b; Neumann et al., 1993; Pradella et al., 2002).

Neben diesen mikrobiologischen Aspekten zeichnen sich Myxobakterien als potente Produzenten von biologisch aktiven Naturstoffen aus.

1.2 Myxobakterien als Naturstoffproduzenten

Seit Flemings Entdeckung des aus Pilzen gewonnenen Antibiotikums Penicillin (Fleming, 1929) werden weltweit Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Sekundärmetaboliten hin untersucht. Diese, meist niedermolekulare Produkte des nicht lebensnotwendigen Sekundärstoffwechsels, haben häufig eine toxische, oder wachstumshemmende Wirkung auf andere Mikroorganismen, Pilze und weitere Eukaryonten. Die Bedeutung des Sekundärstoffwechsels wird unterschiedlich diskutiert. So wird z. B. angenommen, dass die Produzenten sich damit einen Standortvorteil verschaffen, indem Nährstoffkonkurrenten am Wachstum gehindert werden. Inzwischen

werden viele solcher Metabolite im industriellen Maßstab hergestellt und finden ihre Anwendung in der Bekämpfung von Infektionen und anderen Krankheiten wie Krebs oder in der Landwirtschaft zur Kontrolle von ertragsmindernden Schädlingen (Anke et al., 1977; Schreier, 1997). Seit Anfang der achtziger Jahre konnten im Rahmen eines Screeningprogramms an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig Myxobakterien als äußerst interessante und vielseitige Produzenten von bioaktiven Naturstoffen beschrieben werden (Reichenbach et al., 1984; Reichenbach und Höfle, 1993).

Bis Ende der 90er Jahre konnten aus Myxobakterien rund 80 neue und 350 Varianten dieser Naturstoffe isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden (Reichenbach und Höfle, 1999). Eine Auswahl isolierter Naturstoffe ist in Abb. 1 gezeigt.

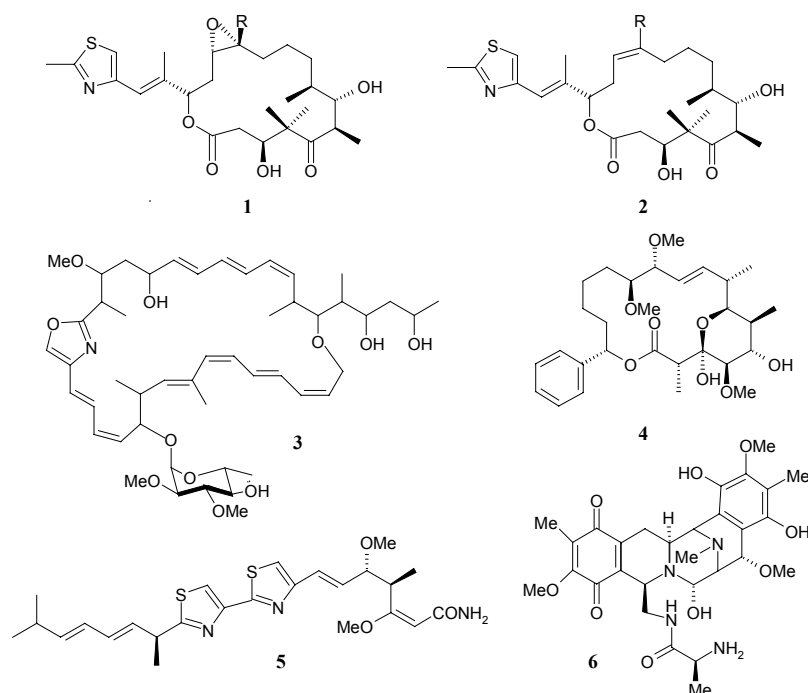


Abb. 1: Ausgewählte Strukturen myxobakterieller Sekundärstoffe

1. R=H Epothilon A R=Me Epothilon B; 2. R=H Epothilon C R=Me Epothilon D 3. Chivosazol; 4. Soraphen; 5. Myxothiazol; 6. Saframycin

Diese Anzahl an Sekundärmetaboliten lässt die Myxobakterien auf Platz 4 hinter der großen Gruppe der Actinomyceten als potente bakterielle Naturstoffproduzenten stehen.

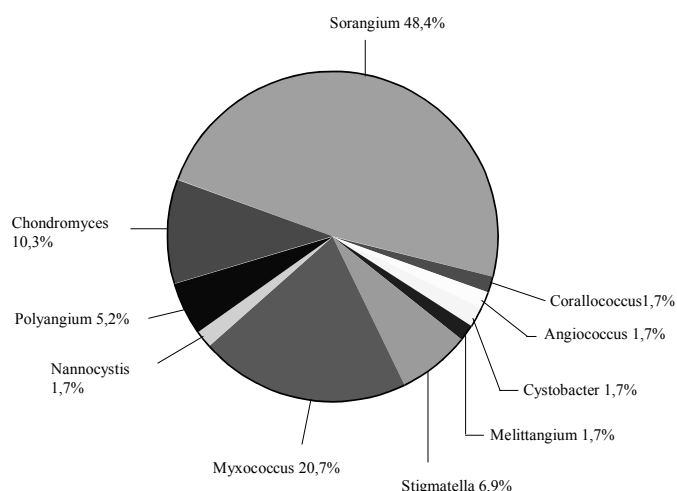


Abb. 2: Anteil und Verteilung isolierter Naturstoffe aus Myxobakteriengattungen in % der Gesamtisolate

(Gerth et al., 2003)

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist die Gattung *Sorangium* eine ganz besonders talentierte Gruppe unter den myxobakteriellen Naturstoffproduzenten. Die Anzahl der aus einem Stamm isolierten Substanzen kann völlig unterschiedlich zur Anzahl isolierter Substanzen eines anderen Stammes derselben Species sein. Aus dem Myxobakterienstamm *S. cellulorum* So ce12 konnten z. B. mehr als vier unterschiedliche Sekundärstoffe isoliert werden (Reichenbach und Höfle, 1999). Die Entdeckung solcher Multiproduzenten lässt vermuten, dass das genetische Potential von Myxobakterien zur Bildung von Sekundärstoffen weit größer ist, als sich aufgrund der bisher aus einem Stamm isolierten Substanzen ableiten lässt. Molekularbiologische Untersuchungen stützen diese These (Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 2001b). Auch Streptomyceten besitzen weit mehr Gene für die Bildung von Sekundärstoffen, als man aufgrund der aus ihnen isolierten Komponenten vermuten durfte (Hopwood, 1997; Sosio et al., 2000).

Die aus Myxobakterien isolierten Naturstoffe stellen chemisch vor allem makrozyklische Lacton- und Lactamringe sowie lineare oder zyklische Peptide dar. Häufig handelt es sich dabei um neue Leitstrukturen. Nur ein kleiner Teil der isolierten Substanzen ist bereits aus anderen bakteriellen Quellen bekannt. Hierzu gehören aus

dem Produzenten *M. fulvus* das Pyrrolnitrin (Gerth et al., 1982), ursprünglich isoliert aus der Gattung *Pseudomonas* (Arima et al., 1964, Hammer et al., 1997) und Saframycin (Irschik et al., 1988), einem zyklischen Polypeptid, welches bereits aus der Gattung *Streptomyces* (Arai et al., 1977) beschrieben wurde.

Das durchschnittliche Molekulargewicht der aus Myxobakterien gewonnenen Verbindungen beträgt 400-700 Da. Die anfängliche Produktionsrate der Zellen in komplex zusammengesetzten Nährmedien ist meist sehr niedrig und beträgt nur 0,5 bis 20 mg/l, was zur Isolierung der Metabolite im industriellen Maßstab eine Fermentation von über 100 l erfordert (Reichenbach und Höfle, 1999).

Die aus Myxobakterien isolierten Substanzen zeigen meist einen ungewöhnlichen oder gar neuen Wirkmechanismus bei der Interaktion mit dem Zielorganismus bzw. den Zielzellen. Unter den isolierten bioaktiven Sekundärmetaboliten befinden sich Stoffe wie das Soraphen (s. Abb. 1; Gerth et al., 1994) aus *S. cellulosum* So ce26, einem makrozyklischen Lacton mit einem unsubstituierten Phenylring. Soraphen, welches sehr effizient und spezifisch pilzliche Acetyl-CoA-Carboxylasen inhibiert.

Myxothiazol (Gerth et al., 1980; Abb.1), Stigmatellin (Kunze et al., 1984; Höfle et al., 1984) und die Aurachine C und D (Kunze et al., 1987) sind Inhibitoren der Elektronentransportkette am Complex III. Inhibitoren des Complex I finden sich mit Myxalamid (Gerth et al., 1983) und den Aurachinen A und B (Kunze et al., 1987). Die Epothilone (s. Abb. 1, Gerth et al., 1996; Höfle et al., 1996) zeigen ihren Wirkmechanismus als Cytostatika (siehe Abschnitt 1.8).

1.3 Biochemie von Polyketidsynthasen

Viele der heute bekannten und in Medizin, Tiermedizin oder Pflanzenschutz angewendeten bioaktiven Naturstoffe werden von Enzymen synthetisiert, die als Polyketidsynthasen (PKS) bezeichnet werden (Hopwood et al, 1997). Die Produkte dieser Biosynthesen, Polyketide, sind in ihrer chemischen Klassifizierung sehr vielfältig. Allen Polyketiden gemeinsam ist die zur Fettsäuresynthese analoge Biosynthese, bei der aktivierte C₂-Einheiten an ein Startermolekül addiert werden. Viele Polyketide sind inzwischen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien isoliert und beschrieben worden (Staunton und Weissman, 2001). Vertreter sind z. B. die Mycotoxine Patulin

(Vorstufe 6-Methylsalicylsäure) aus *Penicillium patulum* (Staunton und Weissman, 2001) und die Aflatoxine aus *Aspergillus flavus* (Bennett et al., 1994). Die meisten Vertreter der Polyketide wurden aus der Familie der Actinomyceten isoliert. Zu ihnen gehören z. B. Tylosin, Monensin A, Rifamycin S und Erythromycin.

Die katalytischen Einheiten (Domänen) von Polyketidsynthasen sind bei der Biosynthese für die Verlängerung einer aktivierten C_2 oder C_3 - Einheit der wachsenden Kohlenstoffkette verantwortlich (s. Abb. 3; Keating und Walsh, 1999). Das Minimum einer funktionellen Einheit für den Einbau der Carbonyleinheiten besteht aus den Domänen einer β -Ketoacylsynthase (KS), einer Acyltransferase (AT) und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP). ACPs werden in einem posttranslationalen Schritt von der Apo- in eine Holoform umgewandelt (Keating und Walsh, 1999). Dazu wird mit Hilfe einer Phosphopantetheinyltransferase (Ppant) ein Phosphopantetheinrest von Acetyl-CoA auf einen Serinrest (-OH) des ACP übertragen. An diesem ca. 20Å langen Arm ist die wachsende Polyketidkette als Thioester gebunden und wird zwischen den aktiven Domänen weitergereicht. Am Beginn einer Polyketidsynthase steht ein Lademodul, meist mit einer AT und ACP-Domäne (s. Abb. 3a). Neben Lademodulen mit einer AT und einem ACP sind auch Module mit weiteren Domänen oder Mischungen aus Lade- und Verlängerungsmodul beschrieben (Silakowski et al., 1999, Silakowski et al., 2001a). Als Abwandlung einer KS kann sich auch eine KSQ Domäne im Lademodul befinden. Dabei wird an der aktiven Stelle der KS (Aparicio et al., 1996), neben den beiden Histidin-Reste ein Austausch von Cystein (C) gegen Glutamin (Q) beobachtet. In dieser Form ist diese Domäne verantwortlich für die Decarboxylierung eines ACP gebundenen Malonylthioesters um damit Acetat als Starter zu erhalten (Bisang et al., 1999). Als Startermoleküle für die Biosynthese von Polyketiden werden von Acetyl-CoA, über Propionyl-CoA und Butyryl-CoA viele verschiedene über Coenzym A aktivierte Moleküle gefunden. Startermoleküle können dabei auch aus dem Aminosäurestoffwechsel stammen (Moore und Hertweck, 2002, Mahmud et al., 2002). Die AT-Domäne ist für die Erkennung und den Transfer spezifischer, aktivierter Moleküle auf das nachfolgende ACP bei der Biosynthese und in Lademodulen verantwortlich.

Durch die Aktivitäten der weiteren Domänen werden die Startermoleküle verlängert. Dazu werden zunächst durch Polyketidsynthase unabhängigen Enzymen Acetyl-CoA

oder Propionyl-CoA biotinabhängig carboxyliert, welche dann als Malonat oder Methylmalonat in die wachsende Kette eingebaut werden. Die Decarboxylierung und Claisen-ähnliche Kondensation wird über die Funktion der KS am aktiven Cystein vollzogen. Dazu erfolgt von der Thiolgruppe der KS ein nucleophiler Angriff auf die am voranstehenden ACP gebundene Kohlenstoffkette. Die am nachfolgenden ACP gebundene Verlängerungseinheit wird durch die Aktivität der KS decarboxyliert und es entsteht ein Carbanion, welches in einer nucleophilen Reaktion die am KS lokalisierte Kette bindet und damit verlängert (s. Abb. 3b). Weitere Schritte der Reduktion der entstandenen Ketofunktion können an der Ketoreduktasedomäne (KR), Dehydratisierung an der Dehydratasedomäne (DH) und erneuter Reduktion an der Enoylreduktasedomäne (ER) stattfinden (s. Abb. 3d). Diese Enzymaktivitäten können aber im Gegensatz zu den Fettsäuresynthasen auch fehlen.

Am C-terminalen Ende des letzten Moduls wird die synthetisierte Kette an einer Thioesterasedomäne (TE) durch Hydrolyse oder Zyclisierung freigesetzt (s. Abb. 3c).

Weitere Erläuterungen zur Funktionsweise von PKS finden sich in den Übersichtsartikeln von Staunton und Weissman (2001) und Moore und Hertweck (2002).

PKS lassen sich in drei verschiedene Klassen Typ I-III unterteilen. PKS des Typ I sind modular und linear aufgebaut. Merkmal für diese Nomenklatur ist die Entdeckung, dass die Domänen in Modulen zusammengefasst sind und eine Einheit bilden. Dabei existiert für jede Verlängerung und ggf. Reduktion des wachsenden C₂- oder C₃-Körpers ein eigenes Modul (siehe auch Abschnitt 1.4). Dieser Aufbau der Multienzymkomplexe ähnelt dabei den Fettsäuresynthasen von Eukaryonten, da alle aktiven Domänen eines Moduls sich in einer Polypeptidkette befinden. PKS zur Bildung aromatischer Polyketide werden als Typ II bezeichnet. Die katalytischen Einheiten der Polyketidsynthasen liegen dabei als getrennt lösliche Proteine vor. Diese bilden dann Multienzymkomplexe im Gegensatz zu den multifunktionalen Enzymen des Typ I. Typ II- Enzyme ähneln den bakteriellen Fettsäuresynthasen.

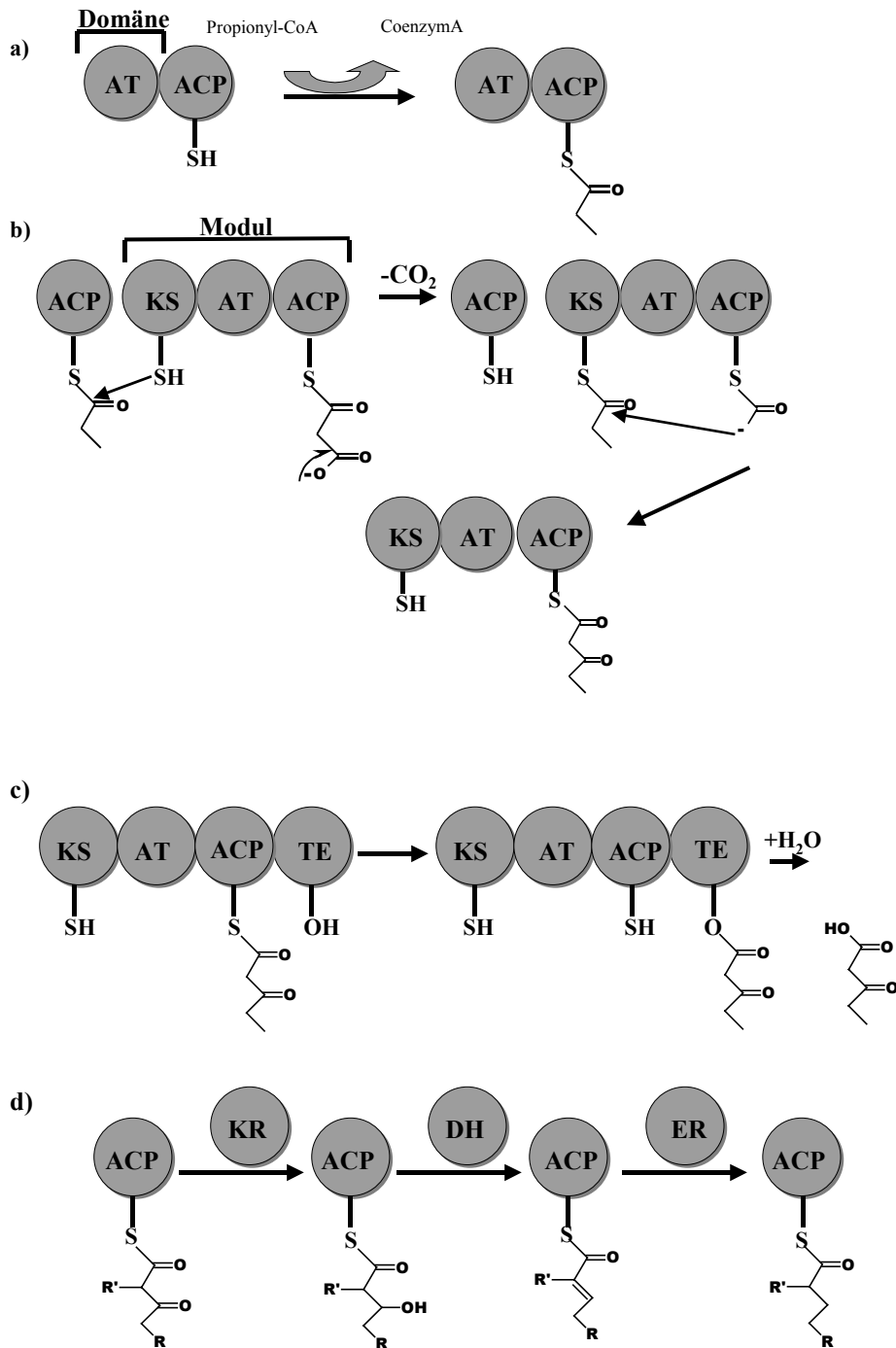


Abb. 3: Chemie der Biosynthese von Polyketiden an Domänen von Polyketidsynthasen.

Beladung eines Startermoduls mit Methylmalonyl-CoA; b) Elongation des Startermoleküls mit Malonat als C₂-Einheit; c) Hydrolytische Freisetzung des entstandenen Diketids; d) Zusätzliche (optionale) Enzymdomänen zur Reduktion des entstandenen Ketons. Gezeigt sind Module und Domänen von PKS. Einzelheiten s. Text. Abkürzungen: ACP Acyl-Carrier-Protein, DH Dehydrogenase, ER Enoylreduktase, KR Ketoreduktase, KS β-Acyl-Ketosynthase, TE Thioesterase

Inzwischen konnte zu den Polyketidsynthesen des Typs I und II ein weiterer Typ hinzugefügt werden. Es handelt sich dabei um Chalkonsynthesen-ähnliche PKS (Typ III), die bis zu ihrer Beschreibung in Bakterien im Jahr 1999 zuvor nur in Pflanzen bekannt waren (Funa et al., 1999).

1.4 Genetik von Polyketidsynthesen

Mit der Sequenzierung und Veröffentlichung der Gene, die für die Enzyme der Actinorhodinsynthese aus *Streptomyces coelicolor* codieren (Malpartida und Hopwood, 1984), konnten die ersten Vergleiche von PKS und Fettsäuresynthesen bezüglich Aufbau und Funktion gezogen werden. Die Entdeckung der Gene zeigte, dass Actinorhodin von einer PKS Typ II gebildet wird, wobei die einzelnen, katalytischen Domänen auf separaten Proteinen vorliegen. Inzwischen konnte das Wissen über die Genetik der PKS mit dem Auffinden und der Analyse vieler verschiedener Polyketidsynthesen bzw. ihrer Gencluster erweitert werden. Ausgangspunkt für die Analyse von Typ I PKS bildete die Entdeckung der Gene aus *Saccharopolyspora erythraea*. Bei den daraus abgeleiteten Proteinen, handelt es sich um eine Polyketidsynthase des Typ I, die die Biosynthese von 6-Desoxyerythronolid B (6-dEB), das Aglycon des Erythromycins katalysiert (Cortes et al., 1990; Tuan et al., 1990; Bevitt et al., 1992; Donadio et al., 1991, Donadio und Katz, 1992). Ähnlich wie bei einem Produktionsband in einer Fabrik liegen die Domänen zusammengefasst in Modulen linear hintereinander. Entsprechend dem wachsenden Molekül konnten die linearen, nacheinander geschalteten Domänen in ihrer linearen Funktion erkannt werden. Mit der wachsenden Zahl bekannter PKS-codierender DNA-Sequenzen wurden in den Domänen konservierte Bereiche identifiziert (Tang et al., 1998). Durch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen innerhalb der Domänen wurde die Suche nach weiteren PKS- Genen in den Genomen verschiedener Naturstoffproduzenten erleichtert.

Häufig werden weitere Modifikationen, wie Hydroxylierung, Methylierung oder Glykosylierung nach der Freisetzung vollzogen. Im Falle des Erythromycins schliessen sich nach der Biosynthese von 6-Deoxyerythronolid B Glykosilierungen an. Aber auch Oxydation mit Hilfe Cytochrom P-450 abhängigen Enzymen, z.B. EryF (Anderson und Hutchinson, 1992), C- oder N-Methylierungen werden bei verschiedenen Biosynthesen, wie zum Beispiel den Aminocoumarinen (Li et al., 2002) gefunden. Die Gene dieser

modifizierenden Enzyme können dabei einzeln innerhalb oder außerhalb des Genclusters liegen. Einige, wie z. B. Methyltransferase-codierende Gene, wie beim Bleomycin- oder Myxothiazolbiosynthesegencluster (Du et al., 2000; Silakowski et al., 1999), können aber auch inmitten der Modulsequenzen der PKS entdeckt werden

1.5 Biochemie und Genetik von Polypeptidsynthetasen

Eine weitere große Gruppe bioaktiver Sekundärmetabolite wird von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisiert (Marahiel et al., 1997, von Döhren, 1997), z. B. Bacitracin, Surfactin, Tyrocidin, Enterobactin und Gramicidin S. Nach einem Vorschlag von Prof. Marahiel, können bei NRPS lineare, iterative und nicht-lineare Typen (A, B und C) unterschieden werden (Mootz et al., 2002). Beim iterativen Typ (B) werden Module mehrmals im Zuge der Verlängerung der wachsenden Polypeptidkette, wie z. B. bei der Enterobactinsynthetase verwendet. Als nicht-linear (Typ C), wie beider Myxochelinsynthetase, können einzelne Domänen mehrere enzymatische Schritte durchführen, wobei der Aufbau der Domänen nicht den im weiteren aufgeführten linearen Typ entspricht, und die Funktion der Proteine häufig noch nicht genauer charakterisiert wurde. NRPS vom linearen Typ (A) sind multifunktionale Enzyme, die proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren aneinanderfügen. In einer Konvergenz zu Polyketidsynthetasen werden hier Aminosäuren als Einheiten über eine Peptidbindung zusammengefügt und verlängert. Die katalytischen Einheiten einer NRPS sind Kondensationsdomäne (Cd), Adenylierungsdomäne (Ad) und Peptidyl-Carrier-Protein (PCP). Analog den Reaktionen der PKS wird auch hier das Apo-PCP durch den Phosphopantethein-Arm in die Holoform überführt. Die Aminosäuren werden in einer ATP-abhängigen Reaktion als Aminoacyl-AMP über die Ad aktiviert und am PCP als Thioester gebunden. Die Ad ist dabei spezifisch für die zu aktivierenden Aminosäuren. Die Cd katalysiert anschließend den nukleophilen Angriff und die Verlängerung um eine weitere Aminosäure. Zusätzliche Domänen, die eine weitere Modifikation der Polypeptidkette katalysieren werden, ähnlich den PKS auch bei NRPS gefunden. Es handelt sich dabei um Zyclisierungs- und Heterozyclisierungsdomänen (Roy et al., 1999), Epimerisierungs-, Oxidations- und N-Methylierungsdomänen (Cane, 1997; Konz und Marahiel, 1999).

Entsprechend einer Konvergenz in der Biosynthese der linearen PKS und NRPS (Cane und Walsh, 1999) erscheint es nicht erstaunlich, dass Naturstoffe gefunden werden, die mit Hilfe beider Enzymklassen synthetisiert werden. Dabei können PKS und NRPS als getrennte Enzyme gegenseitig Produkte des anderen Enzyms als Substrat verwenden (Du und Shen, 2001). Das Katalyseprodukt kann auch aus einem PKS/NRPS funktionellen Hybriden hervorgehen, bei dem die Module von PKS und NRPS auf einer einzigen Proteinkette linear angeordnet sind. Beispiele hierfür finden sich z. B. mit Bleomycin (Shen et al., 1999; Du et al., 2000), Microcystin (Nishizawa et al., 1999; Tillett et al., 2000) und Rapamycin (Schwecke und Leadlay, 1995; König et al., 1997). Mit der Kenntnis solcher Biosynthesemaschinerien entstehen moderne Ansätze der Biokombinatorik um Funktionen einzelner Module zu erörtern und diese mit weiteren bekannten Teilen von PKS und NRPS-Modulen zu kombinieren, um neue Produkte oder Produktvarianten zu synthetisieren (Chen et al., 2001; Walsh, 2002).

Die Erforschung der Biosynthesen von Naturstoffen in Myxobakterien, die in den letzten Jahren seit der erstmaligen Beschreibung des Saframycinbiosynthesegenclusters (Pospiech et al., 1995) intensiviert wurde, konnte neue Aspekte zu dem Feld der PKS und NRPS beitragen. So wurden bei Myxobakterien ebenfalls Biosynthesegencluster beschrieben, die zu PKS, NRPS und PKS/NRPS- Hybriden gehören (s. 1.6 und 1.8). Beispiele sind das Myxothiazol (Silakowski et al., 1999) und das Epothilon (Molnar et al., 2000).

1.6 Genetik ausgewählter Biosynthesen aus Myxobakterien

Erste Untersuchungen zur Genetik des Sekundärstoffwechsels bei Myxobakterien erfolgten an der Biosynthese von Soraphen und Saframycin Mx1. Aufgrund der Struktur von Soraphen (s. Abb. 1) aus *S. cellulosum* So ce26 (Gerth et al., 1994) wurde für die Biosynthese eine PKS, für die Biosynthese des antimikrobiellen und cytostatischen Saframycins (s. Abb.1) aus *M. xanthus* (Irschick et al., 1988) eine NRPS postuliert. Die untersuchten Genregionen zeigten in Datenbankvergleichen Homologien zu den postulierten Enzymen. Mit Hilfe von Geninaktivierungen der untersuchten Genbereiche über gezielte Insertionsmutagenese wurden jeweils Mutanten erhalten, die besagte Moleküle nicht mehr produzierten. (Schupp et al., 1995; Pospiech et al., 1995; Pospiech et al., 1996).

Nachdem sich viele Stämme von Myxobakterien als potente Sekundärstoffproduzenten erwiesen haben (siehe 1.2), wurde auch in deren Genomen weitere PKS und NRPS codierende Gene bzw. Gencluster entdeckt. (Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 2001b).

Die meisten Biosynthesegencluster wurden in Stämmen von *M. xanthus* und *St. aurantiaca* identifiziert, da für diese Species Methoden für die Geninaktivierung mit hoher Effizienz etabliert wurden (Silakowski et al., 2001b; Weinig et al., 2003a). So konnten in *St. aurantiaca* Sg a15 die Gencluster für Myxalamid (Silakowski et al., 2001a), Stigmatellin (Gaitatzis et al., 2002), den Eisenchelator Myxochelin (Silakowski et al., 2000; Gaitatzis et al., 2001b) und in *St. aurantiaca* DW 4/3-1 das Myxothiazolbiosynthesegencluster (Silakowski et al., 1999, Weinig et al., 2003a; Weinig et al., 2003b) identifiziert werden. Aus *S. cellulosum*-Stämmen, für die bisher nur die Methode des DNA-Transfers über Konjugation beschrieben ist (Jaoua et al., 1992; Schupp et al., 1995; Pradella et al., 2002; Kopp et al., 2004), wurden nur wenige Biosynthesegencluster (s. Abschnitt 1.8) identifiziert

Das Stigmatellinbiosynthesegencluster (Gaitatzis et al., 2002) zeigt bezüglich des Aufbaus Abweichungen im Vergleich zu anderen Polyketidsynthasen Typ I. Das erste Modul stellt eine Kombination von Lade- und erstem Verlängerungsmodul dar. Beginnend mit einem ACP und einer KS sind hier zwei AT's im Modul eingebettet. Die Homologie des C-terminalen Endes zeigt statt der erwarteten TE- eine Zyklisierungsdomäne, wie sie bei NRPS gefunden werden. Diese scheint für die Zyklisierung und Aromatisierung verantwortlich zu sein. Wahrscheinlich wird auch ein Modul iterativ bei der Biosynthese genutzt. Dies ist eigentlich typisch bei der Synthese von aromatischen Polyketiden mittels PKS Typ II.

Das Myxalamidbiosynthesegencluster stellt einen PKS/NRPS- Hybriden dar und weist ebenfalls Besonderheiten auf. Neben der Kombination aus Lade- und Verlängerungsmodul ist das Modul MxaB zu nennen, welches auf zwei Proteinen getrennt vorliegt. Das C- terminale Ende des Enzyms bildet ein NRPS- Modul mit einer Reduktionsdomäne, die den entstandenen Metaboliten freisetzt und reduziert. Eine solche Reduktionsdomäne findet sich ebenfalls bei der Biosynthesemaschinerie des Saframycins (Pospiech et al., 1996) und bei der Biosynthese des Siderophors

Myxochelin (Kunze et al., 1989; Gaitatzis et al., 2001b), dessen Gene während der Arbeiten an Enzymen zur Produktion der Aurachine entdeckt wurde (Silakowski et al., 2000).

Mit dem Gencluster des Myxothiazols aus *St. aurantiaca* DW4/3-1 konnte ein weiterer PKS/NRPS-Hybrid beschrieben werden. Dem Aufbau des Moleküls entsprechend (s. Abb.1) finden sich hier 6 offene Leserahmen deren abgeleitete Proteinsequenz fünf PKS-, zwei NRPS- und ein aus NRPS und PKS gemischtes Modul (MtaD) darstellen (Silakowski et al., 1999). Die Module der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase-Einheiten werden zum Einbau von Cystein und der Bildung der bis-Thiazolringe benötigt. Eine ungewöhnliche Monooxygenase- Domäne führt zur Bildung des Säureamides (Weinig et al., 2003a). Zusätzlich konnte eine Phosphopantetheinyl-Transferase, codiert von *mtaA*, beschrieben werden, welche sowohl PCPs als auch ACPs in die aktive Holoform überführt (Gaitatzis et al., 2001a).

Ein weiteres Biosynthesegencluster, das aus dem Produzenten *S. cellulosum* So ce90 stammt und für die Bildung der Epothilone verantwortlich ist, konnte ebenfalls identifiziert werden (s. 1.8).

1.7 Regulation von Sekundärstoffbiosynthesegenen

Die kontrollierte Genexpression erlaubt der Zelle die minutiöse Anpassung an Verhältnisse innerhalb und ausserhalb des Cytoplasmas. Diese Verhältnisse ergeben sich aus dem Energiehaushalt der Zelle, Nährstoffsituation, Zellzyklus und morphologischer Differenzierung, Temperatur sowie osmotischen Bedingungen und interzellulärer Kommunikation. Viele der Kontrollgene und Signalkaskaden die zur morphologischen Differenzierung oder der Regulation des Sekundärmetabolismus gehören, sind inzwischen aus Vertretern der Gattungen *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* und nicht zuletzt aus *E. coli* bekannt. Hierzu gehören Aktivatoren, Repressoren, Serin/Threonin-Kinasen und weitere bakterielle zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme, sowie DNA-Bindeproteine (Umeyama et al., 2002; Moraleda-Munoz et al., 2003; Stock et al., 2000; Tsai et al., 1999; Corbell und Loper, 1995; Makino et al., 1989; Makino et al., 1988). Letzteres betrifft hauptsächlich die

Sigma (σ)-Faktoren, die den Schlüssel der kontrollierten Transkription darstellen (Wösten, 1998).

Sigma-Faktoren sind relativ kleine Proteine, die das RNA-Polymerase-Core-Enzym zum aktiven Holo- Enzym wandeln und mit deren Hilfe spezifische Promotorstrukturen erkannt werden. Zudem wird mit Hilfe des Sigma-Faktors ein sog. offener Komplex an der DNA geschaffen und dadurch die Transkription initiiert. Die Proteine lassen sich in zwei Familien unterteilen, die σ^{54} und σ^{70} -Sigma-Faktoren. Zu der Familie der σ^{70} Faktoren zählen der Standard- σ^{70} -Faktor, der zur Kontrolle der essentiellen Funktionen der wachsenden Zelle beiträgt und die sog. alternativen Sigma-Faktoren (Lonetto et al., 1992). Zu letzteren zählen die „extra-cytoplasmic-function“ (ECF)-Sigma-Faktoren (Lonetto et al., 1994). Diese sind in Signalkaskaden eingebettet, die auf die Veränderung der Umgebung der Zelle reagieren. Eine große Anzahl dieser regulatorischen Proteine ist in die Kontrolle von Genen und Operons involviert, die für die Entwicklung der Zelle und die Sekundärstoffproduktion verantwortlich sind (Missiakis und Raina, 1998; Helmann, 2002). Beispiele dafür sind die Biosynthese von Virulenzfaktoren, wie die Alginatproduktion von *Pseudomonas aeruginosa* (Hughes und Mathee, 1998), Hitzeschockantwort und osmotischer Stress bei *B. subtilis* (Huang et al., 1999; Horsburgh und Moir, 1999) und die Actinorhodinsynthese bei *Streptomyces coelicolor* (Lonetto et al., 1994).

Bei Myxobakterien sind ECF-Sigmafaktoren z. B. an der Zell-Zell-Kommunikation und der Gleitbewegung der Zellen beteiligt (Ward et al., 1998). Ein gut untersuchtes Beispiel stellt die lichtabhängige Regulation der Carotinoidbiosynthese in *M. xanthus* dar. In dem CarQRS- Operon ist CarQ als ECF-Sigmafaktor identifiziert worden (Hodgson, 1993; Hodgson und Murillo, 1993; Botella et al., 1995; Gorham et al., 1996; Martinez-Argudo et al., 1998). CarR, ein membrandurchspannendes Protein agiert als Anti-Sigma-Faktor. Zwischen CarQ und CarR kommt es zu einer Protein-Protein-Wechselwirkung, wobei CarQ an CarR gebunden wird. Durch Lichtinduktion erfährt CarR eine Konformationsänderung, was zur Freisetzung von CarQ führt (Browning et al., 2003). CarQ steuert die Transkription des eigenen Operons sowie das Gen *carS*. Mit CarS, das nun in höherer Konzentration vorliegt wird die Transkription der Gene *carA* und *carB* reguliert. Die von *carA*, *B* und *C* codierten Enzyme sind für die Biosynthese

der Carotinoide verantwortlich. Weitere Regulationsmechanismen, welche die Sekundärstoffbiosynthese von Myxobakterien betreffen, sind bisher nicht beschrieben.

1.8 *Sorangium cellulosum* So ce90

Im Laufe des Screeningprogramms an der GBF in Braunschweig wurden Kulturextrakte auf biologische Inhaltsstoffe und Aktivität hin untersucht (s. 1.2). Der Stamm *S. cellulosum* So ce90, der 1985 aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi aus Südafrika isoliert wurde (Gerth et al., 1996), zeigte nach Fermentation antifungische und cytotoxische Aktivitäten. Die aus der Kulturbrühe von *S. cellulosum* So ce90 isolierten Grundstrukturen waren die Epothilone und die Spirangiene.

1.8.1 Epothilone

Die Epothilone A und B sind Macrolactone mit einem 16 gliedrigen Ring und einer Thiazolseitenkette (s. Abb. 1; Höfle et al., 1996). Sie besitzen eine antifungische und cytotoxische Wirkung (Gerth et al., 1996). Als während eines Screeningprogrammes der Firma Merck (USA) die Epothilone erneut entdeckt wurden und man diesmal zeigen konnte, dass die Wirkung nahezu identisch ist mit der von Taxol (Bollag et al., 1995), begann die Entwicklung dieser Substanz als Chemotherapeutikum für die Bekämpfung von Krebs. Epothilon kann nicht nur aus Kulturextrakten unterschiedlicher *S. cellulosum*- Stämme gewonnen werden, sondern ist auch durch chemische Totalsynthese zugänglich (Schinzer et al., 1997; Yang et al., 1997, Balog et al., 1996). Der Wirkort ist das β -Tubulin der Mikrotubuli. Bei höherer Konzentration verklumpen die Tubuli zu lokalen Bündeln. In geringerer Konzentration von Epothilon wird die Bildung der Mitosespindel gestört. In der Zelle wird Apoptose eingeleitet (Schinzer et al., 1997; F. Sasse, pers. Mitteilung).

Epothilon hat gegenüber Taxol bei einer Chemotherapie möglicherweise Vorteile. So stellte sich heraus, dass die Epothilone A und B eine 2000-5000 fach höhere Aktivität besitzen (Bollag et al., 1995). Ein weiterer Vorteil liegt in der höheren Wasserlöslichkeit, was die Applikation und Formulierung vereinfacht. Epothilon zeigt keinen Endotoxin-Effekt, wie er bei Verwendung von Taxol auftritt (Mühlradt und Sasse, 1997). Auch gegen Taxol resistente Zelllinien wirkt Epothilon. Inzwischen befinden sich verschiedene Epothilonderivate in klinischen Phase III-Studien. Aktivität der

untersuchten Cytostatika zeigt sich dabei gegen metastasierenden Brustkrebs, Eierstockkarzinome, Lungen- und Nierenkrebs (Pressemitteilungen von Bristol Meyers Squibb, Novartis, Roche, Abbott; 2003).

1.8.2 Biochemie und Genetik der Epothilonbildung

Zu Beginn des Jahres 2000 wurde die Sequenz des Epothilonbiosynthesegenclusters von Arbeitsgruppen der Novartis AG, Basel, (Molnar et al., 2000) und Kosan Bioscience (Julien et al, 2000; Tang et al., 2000) veröffentlicht. Auf einem ca. 58 kb umfassenden DNA-Fragment befinden sich sechs Gene, die für PKS und NRPS-homologe Proteine codieren, wie in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Epothilonbiosynthesegenclusters
(nach Molnar et al., 2000)

Gen	Protein	Aminosäuren	Modul	Domäne/ mögliche Funktion
<i>epoA</i>	EPOS A	1421	PKS 0 (Lademodul)	KSY AT ER ACP
<i>epoP</i>	EPOS P	1410	NRPS	HC Ad OX PCP
<i>epoB</i>	EPOS B	1832	PKS 1	KS AT DH KR ACP
<i>epoC</i>	EPOS C	7251	PKS 2	KS AT KR ACP
			PKS 3	KS AT KR ACP
			PKS 4	KS AT DH ER KR ACP
			PKS 5	KS AT DH ER KR ACP
<i>epoD</i>	EPOS D	3798	PKS 6	KS AT KR ACP
			PKS 7	KS AT (DH) MT (KR) ACP
<i>epoE</i>	EPOS E	2439	PKS 8	KS AT (DH) (ER) KR ACP TE
<i>epoF</i>	EPOS F	419		Cytochrom P-450-Oxygenase

Abkürzungen: ACP Acyl-Carrier-Protein, DH Dehydrogenase, ER Enoylreduktase, KR Ketoreduktase, KS β -Acyl-Ketossynthase, KSY KSQ mit Austausch Glutamin gegen Tyrosin (s. Text), TE Thioesterase, HC Heterocyclisierungsdomäne, Ad Adenylierungsdomäne, Ox Oxidationsdomäne, PCP Peptidyl Carrier- Protein. PKS Polyketidsynthase, NRPS nicht-ribosomale Polypeptidsynthetase, () wahrscheinlich ohne Funktion

Im Anschluß an *epoE* findet sich ein weiterer offener Leserahmen, *epoF*, dessen Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu Cytochrom P450 abhängigen Oxygenasen zeigt. Die Funktionalität des untersuchten Bereiches wurde durch Inaktivierungen von *epoP*

und *epoC* via Insertionsmutagenese bestätigt. Erhaltene Mutanten bildeten kein Epothilon (Molnar et al., 2000). Die Epothilonsynthese zeigt einige Besonderheiten, z. B. besitzt das Lademodul anstelle einer KSQ- eine KSY-Domäne (siehe 1.3). Das NRPS-Modul EPOS P enthält eine Oxidationsdomäne, welche wahrscheinlich nach Einbau und Zyclisierung des Cysteins den Thiazolinring zum Thiazolring oxidiert. Darüber hinaus scheint es überzählige oder inaktive Domänen in den Modulen 7 und 8 zu geben, die für die Epothilonsynthese entsprechend des Biosynthesemodells nicht notwendig sind. Möglicherweise inaktive oder überzählige Domänen (KR, DH), sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Freisetzung der Epothilone und die Makrozyklisierung erfolgt letztlich an der Thioesterasedomäne (Boddy et al., 2003).

Die vermutete Funktion von EPOS F bei der Bildung des Epoxides wurde durch Enzymtests mit rekombinant gewonnenen Proteinen (Julien et al., 2000) und mit Hilfe mutagenisierter Stämme (Gerth et al., 2001) bestätigt. Bei heterologer Expression des Genclusters in *M. xanthus* mit inaktiviertem *epoF* (*epoK*, Julien et al., 2000) werden nur noch die Epothilone C und D, die gewöhnlich als Nebenprodukte auftreten (Hardt et al., 2001), gebildet (Julien und Sha, 2002). Damit können Epothilon C und D als Endprodukte der Polyketidsynthese angesehen werden. Die Epothilone A und B entstehen danach durch die Aktivität von EPOS F. Die Methylgruppe, die Epothilon B von A unterscheidet, entsteht durch alternativen Einbau einer Propionat- oder Acetateinheit (Gerth et al., 2000).

1.8.3 Spirangiene

Neben den Epothilonen, bildet *S. cellulosum* So ce90 Spirangiene (Patent DE 42 11 056, 1995; Höfle et al., 1996). Die Spirangiene weisen ein antifungisches Wirkungsspektrum auf. Dabei ist das Spektrum bei allen isolierten Spirangien gleich. Bakterien werden nicht gehemmt (Patent DE, 1995). Zudem zeigen sie eine deutliche Cytotoxizität (K. Gerth und F. Sasse, pers. Mitteilung).

Wie in Abb. 4 gezeigt, handelt es sich bei den Spirangien um Polyketide, von denen sich je zwei in der Kettenlänge unterscheiden. Die Strukturen A/B und C/D bilden *cis-trans*-Isomere und besitzen die relative Molekülmasse 702 bzw. 716. In der Struktur, neben dem myxalamidähnlichen Pentaengerüst, zeichnen sich die Spirangiene durch das Vorhandensein einer Ketalstruktur („Spiro“), ähnlich dem des aus *Streptomyces*

avermililis isolierten Avermectin (Ikeda und Omura, 1997) aus. Bei Vergleichen mit Biosyntheschemata (siehe 1.3) lässt die Struktur von Spirangien A vermuten, dass diese aus 9 Acetat und 7 Propionateinheiten aufgebaut ist. Startermoleküle könnten entweder Acetat (Spirangiene A und B) oder Propionat (Spirangiene C und D) sein. Nach hydrolytischer Freisetzung des Moleküls sollten eine Hydroxylierung (Position 20) und zwei O-Methylierungen (Positionen 23 und 3) erfolgen (s. Abb. 4). Eine Überprüfung, dieser Hypothese mit markierten Bausteinen wurde nicht durchgeführt.

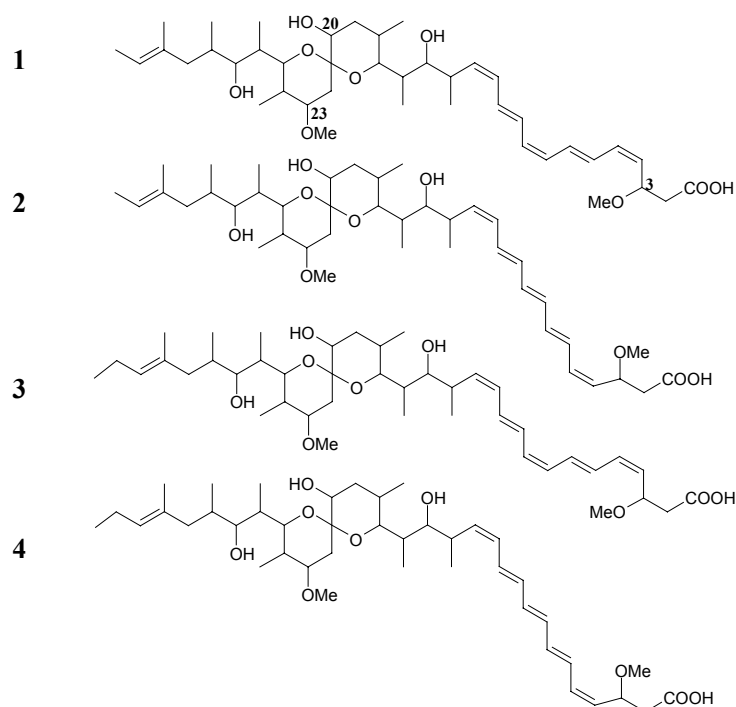


Abb. 4: Strukturen der Spirangiene A-D

1 Spirangien A, 2 Spirangien B, 3 Spirangien C, 4 Spirangien D; bei Spirangien A sind zusätzlich die Positionen der Kohlenstoffatome 3, 20 und 23 angegeben.

Die Spirangiene fallen durch UV- und Hitzeunbeständigkeit auf. Aus diesem Grund ist eine schonende Aufarbeitung zur Isolierung und dem Nachweis der Substanzen nötig. Meist ist eine Anhäufung von Zerfallsprodukten der Spirangiene in HPLC-Analysen zu beobachten. Der schnelle Zerfall minimiert wesentlich die Ausbeute aus den Fermentationen (Patent DE, 1993; H. Steinmetz und K. Gerth, pers. Mitteilung).

1.9 Ziele der Arbeit

Verschiedene Bodenbakterien, wie Streptomyceten und Myxobakterien haben wahrscheinlich ein größeres genetisches Potential zur Bildung von Sekundärstoffen, als das aus den aus ihnen isolierten Verbindungen hervorgeht (Hopwood, 1997; Beyer et al., 1999). Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob *S. cellulosum* So ce90 das genetische Potential besitzt, um nicht nur Epothilone und Spirangiene zu synthetisieren, sondern noch weitere Sekundärstoffe aus der Gruppe der Polyketide und Polypeptide. Dazu sollte im Genom von *S. cellulosum* So ce90, vorliegend als Cosmidgenbibliothek, mit Methoden der Hybridisierung und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach DNA-Fragmenten gesucht werden, die für PKS und NRPS-homologe Gene codieren. Die Cosmidgenbibliothek sollte mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse in Gruppen unterteilt werden. Vorhandene und im Verlauf der Arbeit erhaltene DNA-Sequenzen sollten im Hinblick auf Sekundärstoffbiosyntheseproteine untersucht werden, um so mögliche Biosynthesegencluster, darunter das Epothilon- und Spirangienbiosynthesegencluster zu identifizieren. Um die Funktionalität ausgewählter DNA-Abschnitte zu bestimmen, soll ein Geninaktivierungssystem für *S. cellulosum* So ce90 etabliert werden, mit dessen Hilfe ausgewählte Gencluster näher charakterisiert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Produkt	Bezugsquelle
Antibiotika	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg)
Chemikalien, p.A. Qualität	Fluka (Buchs, Schweiz), J.T. Baker (Deventer, Holland), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Hybond N+/C+-Membranen	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Medienbestandteile für die Anzucht von Bakterien	Cerestar Deutschland (Krefeld), Difco (Detroit, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Kurfürstliche Molkereizentrale (Kassel), Marcor, Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Rohm und Haas (Frankfurt/M)
Oligonukleotide	GIBCO BRL (Eggenstein), Qiagen (Hilden)
TOPO ^{TA} cloning-KIT	Invitrogen (Karlsruhe)
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Enzyme: Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB (Frankfurt)
DNase I (RNase frei)	Sigma (Deisenhofen)
Lysozym	Serva (Heidelberg)
NucleoSpin® Plasmid/Extract	Macherey -Nagel (Düren)
Proteinase K	Serva (Heidelberg)
) Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt)
) Ribonuklease A	Sigma (Deisenhofen)

Fortsetzung Tab. 2

Produkt	Bezugsquelle
SuperscriptII Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA Ligase (einschl. Puffer)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Taq-DNA Polymerase (einschl. Puffer)	Invitrogen (Karlsruhe)
Pfu cloned DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

2.2 Medien und Lösungen

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung bei 121°C für 20 min. autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Erkalten zugesetzt. Für alle Puffer und Medien wurde doppelt deionisiertes Wasser benutzt. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozent (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozent (v/v).

2.2.1 Nährmedien

Medien für *E. coli*

LB-Medium (Miller 1972)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

LB-Agar (Miller 1972)

LB-Medium	
Agar	15 g/l

SOB-Medium (Hanahan 1983)

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

SOC-Medium (Hanahan 1983)

SOB-Medium	
nach dem Autoklavieren steril zusetzen	
Glucose 20mM	

Nach dem Autoklavieren steril zusetzen: MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM

Medien für Myxobakterien:Trypton-Medium (Silakowski et al., 1998) Trypton-Agar (Silakowski et al., 1998)

Trypton	10 g/l	Trypton-Medium	
MgSO ₄	2 g/l	Agar	15 g/l
pH 7,2			

Trypton-Topagar

Trypton-Medium	
Agar	7,5 g/l

Medium M

Soyapepton	1 %
Maltose	1 %
CaCl ₂	0,1%
MgSO ₄	0,1%
Fe(III)-EDTA	8 mg/l
HEPES	1,2%

pH 7,2

Probion (P)-Medium (Pradella et al., 2002)

Pepton S (Marcor)	0,2%
Hefeextrakt	0,2%
Stärke (lösl.)	0,8%
Probion 069	0,4%
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,1%
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,1%
HEPES	100 mM(23,8g/l)
Fe (III)-EDTA	8 mg/l

Nach dem Autoklavieren steril zusetzen

Glucose (sterilfiltriert) 0,2%

pH 7,5

Probion (P)-Agar

Pepton S (Marcor)	0,2%
Stärke	0,5%
Probion 069	0,1%
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,05%
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,05%
HEPES	50 mM

Glucose 0,2%

Agar 1,4%

pH 7,6

Sorangium-Glucose-Medium, ½ CaCl₂

Glucose	0,2%
Trypton	0,2%
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,05%
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,05%
HEPES	1,2%
Fe (III)-EDTA	8 mg/l

pH 7,5

Produktionsmedium E

Hefeextrakt	0,2%
Magermilch	0,4%
Soyamehl, entfettet	0,4%
Stärke	1,0%
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,1%
Fe (III)-EDTA	8 mg/l
Glycerin 86%	0,5%
HEPES	50 mM

pH 7,4

2.2.2 weitere Lösungen:SSC (20 x) Sambrook et al. 1989)

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
pH (mit Citrat eingestellt)	7,0

TAE (50 x) (Sambrook et al. 1989)

Tris	242 g/l
Eisessig	57 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml

Hybridisierungslösung mit Formamid

SSC	5x
N-lauroylsarcosin	0,1%
SDS	0,02%
Formamid	50%
Blockingreagenz	2%

„Probe stripping“ Puffer

NaOH	0,2 M
SDS	0,1%
stripping bei 37°C	

SET-Puffer

NaCl	75 mM
EDTA	25 mM
Tris	20 mM
pH 7,5	

TE-Puffer

Tris/HCl	10mM
pH 7,6	
EDTA	1mM
pH 8,0	

Lösungen für die DNA-Präparation (Sambrook et al., 1989)

Lösung I

Glukose	50 mM
Tris HCL	25 mM, pH 8,0
EDTA	10 mM, pH 8,0

Lösung II

NaOH	0,2 N (frisch angesetzt)
SDS	1%

Lösung III

Kaliumacetat 5M,	60 ml
Eisessig	11,5 ml
H2O	28,5 ml

2.2.3 Antibiotika

Wenn erforderlich wurden den Kulturmedien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100	µg/ml
Chloramphenicol	25	µg/ml
Erythromycin	100	µg/ml
Hygromycin B	100	µg/ml für <i>E. coli</i>
	60	µg/ml für Myxobakterien
Kanamycinsulfat	50	µg/ml
Streptomycin	120	µg/ml für <i>St. aurantiaca</i> DW4/3-1
Tetracyclin	30	µg/ml
Tobramycin	100	µg/ml

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung für die Kontrolle der Flüssigkulturen und für das Einstellen von Zelldichten erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Abmessung eines Kleinstquadrates betrug 0,02 mm Schichtdicke bei einer Kantenlänge von 0,05 mm. Der Zählkammerfaktor betrug damit 2×10^7 . Zählungen wurden über mindestens 16 Kleinstquadrate durchgeführt und gemittelt.

2.3 Bakterien und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien sind in Tab. 3, Plasmide in Tab. 4 und Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Bemerkungen	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F ⁺ proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)]	Bullock et al., 1987
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> HB101 RK600	Sm ^R , recA, thi, pro, hsdR ⁻ M ⁺ ; Cm ^R , oriColE1, RK2 ⁻ Mob ⁺ , RK2 ⁻ Tra ⁺	de Lorenzo et al., 1994
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307	dam-13 ::Tn9, dcm-6, hsdM, RP1-Kan ^R , Chl ^R	Bennett et al., 1977
<i>St. aurantiaca</i> DW 4/3-1	Wildtyp, Str ^R	Qualls et al., 1978
<i>St. aurantiaca</i> DW 4/SB1	mtaB-Mutante, Str ^R , Bleo ^R	S. Beyer, unveröffentlicht
<i>S. cellulorum</i> So ce90	Wildtyp, Epothilon-und Spirangienproduzent, Kan ^R , Tob ^R	Gerth et al., 1996
<i>S. cellulorum</i> So ce90 B2	<i>S. cellulorum</i> So ce90 :UV-mutagenisiert, Epothilon-Überproduzent	Gerth et al., 2000
<i>S. cellulorum</i> So ce10	Wildtyp	Irschick et al., 1994
<i>S. cellulorum</i> So ce12	Wildtyp	Irschick et al., 1995
<i>S. cellulorum</i> So ce1525	Wildtyp	Irschick et al., 1987

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Genotyp/Bemerkung	Referenz
pPUC18/19	ColE1, bla, lacZα, P _{lac}	Vieira & Messing, 1982
pMOD TM	Transposon Integrationsvektor, Ap ^R	Epicentre, Madison, USA
pTOPO®	ColE1, bla, Kan ^R	Invitrogen
pTOPOpro	ColE1, bla, Kan ^R , aphIIp	Pradella et al., 2002
Ωhyg	Hygromycinresistenzkassette aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Blondelet-Rouault et al., 1997
pSUP102	Mobilisierbarer Vektor, Tc ^R , Cm ^R	Simon et al., 1986
pSUP1021	Mobilisierbarer Vektor, Tc ^R , Cm ^R , Bleo ^R	Simon et al., 1986
pEpoF	epoF in pCYB2	N. Gaitatzis, unveröffentlicht

Tab. 5: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Neukonstruierte Plasmide	Konstruktion	Beschreibung
pJKB5	715 bp <i>ScaI</i> -Fragment aus pEpoF in pUC18 <i>HincII</i>	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZα</i> , P _{Lac}
pJKB10	1700 bp PCR-Fragment (HygU-HygD) aus Ωhyg in pTOPOpro <i>BamHI-NdeI</i>	<i>aphIIp</i> , <i>hyg</i> , <i>NdeI</i> -Erkennungssequenz am Translationsstartpunkt angefügt
pJKB11	2,2 kb <i>BamHI-EcoRI</i> (partiell)-Fragment aus pJKB10 in pMOD TM <i>BamHI-EcoRI</i>	<i>aphIIp</i> , <i>hyg</i> , <i>bla</i> , OE
pJKB12	1,49 kb <i>SmaI</i> -Fragment aus Cosmid A7, nachbehandelt mit Taq-DNA-Polymerase in pTOPO®	KS-Bereich <i>spiH</i>
pJKB14	1,5 kb <i>BsaAI-EcoRI</i> -Fragment aus pJKB12 in pSUP1021 <i>ScaI-EcoRI</i>	KS-Bereich <i>spiH</i> zur homologen Rekombination, Tc ^R , <i>aphII</i> , Bleo ^R
pJKB16	2,2 kb <i>EcoRI</i> -(partiell)-Fragment aus pJKB11 in pJKB14 <i>EcoRI</i>	<i>spiH</i> -KS-Fragment zur homologen Rekombination, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aphIIp</i> , Tc ^R , <i>aphII</i> , Bleo ^R
pJKB18	2,1 kb PCR-Fragment (Pup/HygD) in pUT Sm/Sp <i>SmaI</i>	<i>hyg</i> unter Kontrolle P _{<i>aphII</i>} , <i>tnp</i> , OE, Minitransposon auf Basis Tn5
Neukonstruierte Plasmide	Konstruktion	Beschreibung
pJKB19	720 bp <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment <i>epoF</i> aus pJKB5 und 2,2 kb <i>BamHI-EcoRI</i> (partiell)-Fragment aus pJKB10 in pSUP102 <i>BamHI-HindIII</i>	Fragment <i>epoF</i> zur homologen Rekombination, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aphIIp</i> , Cm ^R , ColE1
pJKB20	1,95 kb PCR-Fragment (JKB36/37) aus pJKB10 in pTOPO®	<i>aphII</i> , <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aphIIp</i> , <i>bla</i>
pSUPHyg	2 kb Fragment <i>EcoRI</i> (partiell) aus pJKB20 in pSUP102	mob, ColE1, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aphIIp</i> , Tc ^R , <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> singulär
pJKB21	450 bp PCR-Amplifikat (JKB34/35) aus Cosmid 12 in pTOPO®	Fragment aus <i>spiJ</i> zur Sequenzanalyse eines Frame-shift-Bereiches
pJKB22	450 bp PCR-Amplifikat (JKB34/35) aus Cosmid 30 in pTOPO®	Fragment aus <i>spiJ</i> zur Sequenzanalyse eines Frame-shift-Bereiches

Fortsetzung Tab. 5

Neukonstruierte Plasmide	Konstruktion	Beschreibung
pJKB23	450 bp PCR-Amplifikat (JKB34/35) aus Cosmid 66 in pTOPO®	Fragment aus <i>spiJ</i> zur Sequenzanalyse eines Frame-shift-Bereiches
pJKB24	450 bp PCR-Amplifikat (JKB34/35) aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 chromosomaler DNA in pTOPO®	Fragment aus <i>spiJ</i> zur Sequenzanalyse eines Frame-shift-Bereiches
pJKB26	1,65 kb PCR-Amplifikat (JKB38/39) aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 chromosomaler DNA <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III in pSUPHyg <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III	<i>mob</i> , ColE1, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aph</i> IIp, Amplifikat PKS Pos. 15966-17614 aus Bereich A2 zur homologen Rekombination
pJKB28	480 bp PCR-Amplifikat (JKB 52/53), <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 chromosomaler DNA in pSUPHyg <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III	<i>mob</i> , ColE1, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aph</i> IIp, Fragment <i>spiK</i> , O-Methyltransferase zur homologen Rekombination
pJKB29	810 bp PCR-Amplifikat (JKB 54/55), <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 chromosomaler DNA in pSUPHyg, <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III	<i>mob</i> , ColE1, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aph</i> IIp, Fragment <i>spiL</i> , Cytochr. P450 Monooxygenase zur homologen Rekombination
pJKB30	530 bp PCR-Amplifikat (JKB 56/57), <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 chromosomaler DNA in pSUPHyg, <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III	<i>mob</i> , ColE1, <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aph</i> IIp, Fragment <i>spiZ</i> , Sigmafaktor zur homologen Rekombination
pJKB31	1,8 kb PCR-Fragment (JKB40/41) <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 chromosomaler DNA in pSUPHyg <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III	<i>mob</i> , <i>hyg</i> unter Kontrolle <i>aph</i> IIp, Amplifikat PKS, aus Bereich A5, Contig 11 Pos. 6234-8033 zur homologen Rekombination

2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen und sind in Tabelle 6 aufgeführt. Fett geschriebene Basen kennzeichnen eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Gen/Lokalisation
JKB1	5'-CGTCGCCCCGGCGCGTCCTC-3'	ORF1, A5 contig 11
JKB2	5'-CGCGGTGACCGGCTGCGTCCTG-3'	
JKB11	5'-CTATTCGTCCTCGCTGGTGG-3'	<i>epoA</i>
JKB12	5'-GCATACTCAGGATGGCCAAG-3'	
JKB13	5'-GTAGCAGCGATAACGGCGTG-3'	<i>epoE</i>
JKB14	5'-CGAGATTGTAGATCCTGAAC-3'	
JKB15	5'-GGGGGCCGTCCTTTCAC-3'	5'-Ende Eposequenz
JKB16	5'-ATTCTCTGGCAGCATCTCGT-3'	
JKB20	5'-AGCACCTCCACGACGTCTTC-3'	<i>spiH</i>
JKB21	5'-GACGGACATGAGCGAGTCGA-3'	
A7IU	5'-CGAAGACGTGCTCGATCTCG-3'	<i>spiG</i>
A7ID	5'-ATGCTCGCCGCCCTCGACGA-3'	
A7rU	5'-TCGATCCGGGCTTCTTCTCG-3'	<i>spiJ</i>
A7rD	5'-TCGGCGGAGAACGACTTGCA-3'	
JK91U	5'-GGCTCGCGGAGCACCTGAAC-3'	Cosmid 91 T3-Ende
JK91D	5'-GCTGTCCGTCGATCCGCTCG-3'	
JKCos6U	5'-ACGGTAAGCGCGACTGGCGC-3'	<i>zmaR</i>
JKCos6D	5'-CGTGACCTGGTCCTCCTGGA-3'	
ERM UP	5'-CA CATATG AGCAGTTCGGACGAGC-3'	<i>ermE</i>
ERM D	5'-CTCGATCGCCTGCCGCGTTCCGC-3'	
PUp	5'-GAGAA AAGCTT CACGCTGCCG-3'	<i>aphIIp</i>
PD	5'-CAAT CATATG AAACGATCCTCATCCTG-3'	
HYG U	5'-GAGGTCC CATATG ACACAAGAATCCC-3'	<i>hyg</i>
HYG D	5'-ATTCCCGG GGATCC GGTGATTGA-3'	
JKB32	5'-GATCAAGCTGTTCCGGCGAGC-3'	<i>hyg</i> , internes Fragment
JKB33	5'-CGCAGCAGTTCCGGGAAGAC-3'	
JKB36	5'-GAGCTTCACGCTGCCGCCAAG-3'	<i>hyg</i> , <i>aphIIp</i>
JKB37	5'-GGACCTCTAGGGTCCCCAATTA-3'	
JKB34	5'-CGTGCCGAAGGCGAGCT-3'	<i>spiJ</i>
JKB35	5'-CGCGGAAGAGCGCGTGC-3'	
JKB38	5'-GCGTGG GGATCC ATGCGCATCA-3'	ORF 9, A2
JKB39	5'-GTCGA AAGCTT CGGGGGAGATC-3'	
JKB40	5'-GTGCCG GGATCC GACCCGCCC-3'	ORF 2, A5
JKB41	5'-CTCGCA AAGCTT CCGGCGCGA-3'	
JKB42	5'-AGCTGGCGTTCGACTCGATG-3'	ORF , IS-Element, cos6
JKB43	5'-ACCGGCTCGGTCAGCTCGTCGC-3'	

Fortsetzung Tab. 6

Bezeichnung	Sequenz	Gen/Lokalisation
JKB44	5' -ATTGGTCCGCGGGGGCCGTC-3'	Cosmid 12, T7-Ende
JKB45	5' -AGCGCCCGTGCGCGAGCGCGT-3'	
JKB46	5' -AGGCGGCCGGAGCTCACGTC-3'	<i>spiJ</i>
JKB47	5' -CGTGCCCTTGGCCGCGACGT-3'	
JKB52	5' -GTTCGCGAAGCTTCCGGAACGA-3'	<i>spiK</i>
JKB53	5' -AGCGGGTAGATCTGCTGGCGGC-3'	
JKB54	5' -AGAGGAAGCTTATGATGCCCCG-3'	<i>spiL</i>
JKB55	5' -CATAGGGATCCGGGTCGAAG-3'	
JKB56	5' -GCGGCGAAGCTTCGCGGCGTTCA-3'	<i>spiZ</i>
JKB57	5' -GGCTGGGATCCGCTGAAGCCCGA-3'	
JKB58	5' -AGCTGGAGCCGTTGGCTCGCTTCA-3'	Cos6, IS-Element
JKB59	5' -AGCGCTGCATGAAGCGCCGT-3'	

2.5 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Plasmidtragende Bakterienstämme wurden immer in Anwesenheit entsprechender Antibiotika kultiviert.

2.5.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden in LB-Medium oder auf LB-Agar bei 37°C kultiviert. Dauerkulturen wurden in 25% Glycerin (in LB) bei -80°C gelagert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden Ansätze bezeichnet, die 12-14 Stunden in Flüssigmedium bebrütet wurden.

2.5.2 Anzucht und Fermentation von *S. cellulorum* So ce90

S. cellulorum So ce90 wurde in Sorangium- Glucosemedium oder Probionmedium oder auf Probion-Agarplatten (s. 2.2.1) bei 30-32°C angezogen. Für die Stammhaltung bei Sorangien wurden gut bewachsene Kulturen als Inokulum mit einer Animpfdichte von 10% verwendet. Die Zellen wurden einmal pro Woche in frisches Medium in 250 ml Schüttelkolben mit 50 ml Medium umgesetzt. Flüssigkulturen wurden unter Schütteln (170 Upm) angezogen. Die Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf Zelldichte, Zustand der Zellen (Zelldebris) und Kontamination überprüft.

Dauerkulturen wurden von 3-5 Tage alten Schüttelkulturen durch Zentrifugation (5000 Upm) und Resuspendieren der Zellen in 30% Glycerin (in Medium) angelegt. Diese

wurden bei - 80°C gelagert. Um Einflüsse oder Überalterung der Kultur durch zu häufiges Passagieren der Zellen zu vermeiden, wurden alle 3 Monate Dauerkulturen des Stammes frisch angezogen. Dazu wurde die Dauerkultur (1-2 ml) parallel in Probionmedium (10 ml) und auf P-Agarplatten ausgebracht. Wenn die Kulturen nach ca. einer Woche angewachsen waren, wurden sie als Inokulum für Flüssigmedien benutzt und wie oben beschrieben kultiviert.

Zur Überprüfung der Produktion von Sekundärmetaboliten von *S. cellulorum* So ce90 und abgeleiteten Mutanten wurden die Stämme in Produktionsmedium E mit 2% XAD (s. 2.1.2) in einem Volumen von 100 ml in einem 250 ml Schüttelkolben bei 30°C und 170 rpm für 7-10 Tage inkubiert. Herstellung und Untersuchung der Kulturextrakte erfolgte wie unter 2.16 und 2.17 beschrieben. Im Falle *S. cellulorum* So ce90 wurde der Verlauf der Produktion der untersuchten Sekundärmetabolite anhand einer Fermentation im 10 l-Maßstab in Produktionsmedium E mit XAD und einer täglichen Probenahme von 100 ml Kulturvolumen durchgeführt. Da durch die Technik der Probenentnahme unterschiedliche Mengen an XAD aufgefangen wurden, wurde das Adsorberharz nach der Aufarbeitung getrocknet und gewogen. Anschliessende Verdünnungen bezogen sich auf 1 mg XAD. Für die Fermentation wurde der Stamm in 100 ml Produktionsmedium E ohne XAD angezogen. Eine gut bewachsene 5 Tage alte Kultur diente als Inokulum für 1 l-Medium, verteilt auf zwei 2 l-Schüttelkolben. Nach 3 Tagen diente diese Kultur als Inokulum für den 10 l-Fermenter (Giovanola Freres, Monthey, Schweiz). Die Fermentation wurde bei 32°C, einer Belüftungsrate von 300 l O₂/Stunde und einer Rührgeschwindigkeit von 250 rpm durchgeführt. Die Fermentation wurde nach 12 Tagen abgebrochen, nachdem keine weitere Erhöhung der Produktion von Epothilon und Spirangien nachweisbar war. Für die Isolierung und Identifizierung gebildeter Spirangiene über HPLC-MS aus der Mutante JKB19 wurde die Kultur in Schüttelkolben im 4 l-Maßstab in Produktionsmedium E mit XAD fermentiert. Als Inokulum dienten jeweils 10% einer gut gewachsenen Vorkultur, die ohne XAD unter Selektionsbedingungen mit 60µg/ml Hygromycin B angezogen wurde.

Für die Strukturbestimmung der aus der Mutante *S. cellulorum* So ce90 JKB19I isolierten Komponenten wurde eine weitere Fermentation im 70 l-Maßstab von Dr. H. Steinmetz in der Abteilung Naturstoffe von Prof. Höfle durchgeführt.

2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der alkalischen Lyse-Methode nach Sambrook et al., 1989. Dazu wurden ca. 1,5 ml einer *E. coli* ÜK in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und bei 12000 g bei 4°C für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 100 µl der eisgekühlten Lösung I (s. 2.2.2) durch Vortexen resuspendiert. Danach werden 200 µl der Lösung II zugegeben und durch invertieren des Reagiergefäßes gemischt. Das Reagiergefäß wird auf Eis inkubiert und 150µl der eisgekühlten Lösung III (s. 2.2.2) dazugegeben. Die Lösungen werden durch invertieren des Reagiergefäßes gemischt und das Gefäß auf Eis 3-5 Min. inkubiert. Anschließend wird die Lösung bei 12000 g für 5 Min. bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Die DNA wird durch die Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 12000 g für 5-10 Min. bei 4°C. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet vollständig getrocknet. Die DNA kann anschließend in Wasser oder TE-Puffer (s. 2.2.2) aufgenommen werden. Plasmid- DNA für Sequenzierreaktionen oder Ligationen wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert.

Myxobakterien-Gesamt-DNA wurde entsprechend der von Neumann et al. (1992a) beschriebenen Methode nach folgendem verändertem Protokoll isoliert:

Kulturen des Stammes *St. aurantiaca* DW4/3-1 wurden in 50 ml Tryptonmedium angezogen. Der gesamte Ansatz wurde mit 5000 g bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet kann direkt weiterverarbeitet oder für eine spätere Isolierung der DNA bei -20°C eingefroren werden.

Zellen von *S. cellulorum* So ce90 wurden in 100 ml Medium P oder Medium M (s. 2.1.2) angezogen. Von einer 5 Tage alten, gut bewachsenen Kultur wurden 25 ml zentrifugiert. Das Zellpellet konnte für eine spätere Aufarbeitung bei -20°C gelagert werden.

Die Zellpellets der Myxobakterien wurden in 5 ml SET-Puffer (s. 2.1.2) resuspendiert und in ein 15 ml Reagiergefäß überführt. 500 µl einer 10%ige SDS-Lösung und 500 µl

einer Proteinase K-Lösung (1mg/ml) wurden dazugegeben und vorsichtig geschüttelt. Diese homogene Lösung wird anschließend bei 55°C unter gelegentlichem Schütteln für mindestens 2 Stunden bis zur vollständigen Zell-lyse inkubiert. Folgend wird 1/3 Volumen einer 5 molaren NaCl- Lösung und 1 Volumen Chlorophorm zugesetzt. Die erhaltene Lösung wird anschließend bei Raumtemperatur auf einem Über-Kopf-Schüttler für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Mit dem sich anschließenden Zentrifugationsschritt (4000 g, 10 Minuten) wurden die Phasen deutlich getrennt und die obere, wässrige Phase mit einer Pasteurpipette in ein neues Reagiergefäß überführt. Dieser Schritt muss bis zum Erhalt einer klaren wässrigen Phase wiederholt werden. Die DNA wird durch die Zugabe eines Volumens Isopropanol präzipitiert und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Die DNA wird dreimal mit Ethanol (70%) gewaschen, bei 55°C getrocknet und in 500-1000 µl TE über Nacht bei derselben Temperatur gelöst.

Für die Isolierung von Gesamt-DNA hoher Qualität wurde der PCR-High-Pure-Template Preparation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA wurde in Agarosegelen nach der bei Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode mit 1 x TAE als Elektrophoresepuffer getrennt. Als Längenstandard wurden „1 kb Größenstandard“ (Gibco BRL, Eggenstein), „100 bp Größenstandard“ (Gibco BRL, Eggenstein) oder *EcoRI-HindIII*-hydrolysierte λ -DNA verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose Ethidiumbromid in der Konzentration von 0,01 µg/ml.

2.8 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers.

2.9 *In vitro*-Rekombination von DNA

Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA-Molekülen erfolgte wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben oder entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Enzyme wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern eingesetzt. Ligationen wurden über Nacht bei 16°C durchgeführt.

2.10 Klonierung von Inaktivierungsplasmiden

2.10.1 Klonierung von pJK10

Die Klonierung erfolgte wie bei Pradella et al. (2002) beschrieben. Dazu wurde ein 1,7 kb großes Amplifikat von *Ωhyg* (Blondelet-Rouault et al., 1997) mit den Oligonukleotiden HygU und HygD (s. Tab. 6) mittels PCR gewonnen. Dieses codiert die Hygromycinphosphotransferase und den Ω -Terminator. Das PCR-Fragment wurde mit den Endonukleasen *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert und in den mit denselben Enzymen hydrolysierten Vektor pTOPOpro (Pradella et al., 2002) ligiert. Die Hygromycinresistenz stand somit unter Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes (*aphIIp*) und wurde von *E. coli* und Myxobakterien erfolgreich exprimiert. Eine Plasmidkarte von pJKB10 ist in Anhang 2 dargestellt.

2.10.2 Klonierung des Plasmides pJKB16

Zur Geninaktivierung von *spiH* des A7 Genlocus wurde das mobilisierbare Plasmid pSUP1021 (Simon et al., 1986) mit der Hygromycinresistenzkassette aus pJKB10 und einem 1,4 kb großen DNA-Fragment aus *spiH* zur homologen Rekombination verwendet. Dazu wurde das Cosmid A7 mit *SmaI* hydrolysiert und ein ca. 1,5 kb großes Fragment mittels Gelelektion isoliert. Dieses wurde nach Behandlung mit Taq-Polymerase für einen A-Überhang entsprechend den herstellernangaben in den Vektor pTOPO ligiert. Das resultierende Plasmid hat die Bezeichnung pJKB12. Das aus pJKB12 über Hydrolyse mit *BsaAI* und *EcoRI* reisolierte DNA-Fragment wurde in das Plasmid pSUP 1021 ligiert, welches zuvor mit *ScaI* und *EcoRI* linearisiert wurde (pJKB14). Aus pJKB10 wurde die Hygromycinresistenzkassette (ca. 2,2 kb) über Hydrolyse mit *BamHI* und partieller Hydrolyse mit *EcoRI* isoliert (die Sequenz der Hygromycinphosphotransferase enthält eine *EcoRI*-Erkennungssequenz) und in pMOD

(Epicentre, Madison, USA), der mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelt wurde, ligiert. Der resultierende Vektor hat die Bezeichnung pJKB11. Aus pJKB11 wurde die Resistenzkassette über eine partielle Hydrolyse mit *EcoRI* erhalten (2,2 kb) und in pJKB14, linearisiert mit *EcoRI* ligiert. Dieser mobilisierbare Vektor mit Hygromycinresistenz hat die Bezeichnung pJKB16.

2.10.3 Klonierung des Plasmides pJKB19

Für die Geninaktivierung von *epoF* wurde der mobilisierbare Vektor pJKB19 konstruiert. Ein 715 bp großes DNA-Fragment aus pEpoF (Gaitatzis, unveröffentlicht; s. Tab. 3), gewonnen über Hydrolyse mit *ScaI* wurde in den Vektor pUC18 ligiert, der zuvor mit *HincII* linearisiert wurde (pJKB5). Das Fragment wurde durch Hydrolyse mit *EcoRI* und *HindIII* (720 bp) aus pJKB5 isoliert und zusammen in einer Doppelligation mit einem 2,2 kb Fragment aus pJKB10 (*EcoRI* partielle Hydrolyse und *BamHI*) in den Vektor pSUP102, der mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *HindIII* linearisiert wurde, ligiert.

2.10.4 Klonierung des Plasmides pSUPHyg und weiterer Inaktivierungsplasmide

Für weitere Inaktivierungsplasmide wurde auf Basis des mobilisierbaren Plasmides pSUP102 (Simon et al., 1986) der Vektor pSUPHyg konstruiert, der für die Klonierung von homologen DNA-Fragmenten singuläre Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII* besitzt.

Dafür wurden mit Hilfe der Oligonukleotide JKB36 und JKB37 die *BamHI* und *HindIII* Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende der Kassette entfernt und das erhaltene Amplifikat von 1,9 kb in pTOPO[®] zwischen die beiden *EcoRI*-Erkennungssequenzen ligiert (pJKB 20). Aufgrund der in dem Hygromycinphosphotransferasegen vorhandenen *EcoRI*-Erkennungssequenz wurde durch eine partielle Hydrolyse mit dem Enzym *EcoRI* das resistenzvermittelnde Konstrukt aus diesem Vektor erhalten und in den Vektor pSUP102, welcher zuvor mit *EcoRI* hydrolysiert wurde, ligiert. Dieser Vektor hat die Bezeichnung pSUPHyg. Eine Plasmidkarte von pSUPHyg ist in Anhang 3 dargestellt.

Die Inaktivierungsplasmide pJKB26, pJKB28, pJKB29, pJKB30 und pJKB31 wurden über die Hydrolyse von pSUPHyg mit *BamHI* und *HindIII* und Ligation mit über PCR-

Reaktionen gewonnenen und mit denselben Enzymen hydrolysierten DNA-Fragmenten wie in Tabelle 5 aufgeführt, gewonnen.

2.11 Nicht radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden durch den Einbau von DIG-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) markiert. Dies erfolgte nach dem Prinzip des „Random Primed Labeling“ (Feinberg & Vogelstein 1983, DIG High Prime Kit; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

2.12 DNA-Hybridisierungen an immobilisierter DNA und Detektion der markierten DNA-Sonden

Zur Übertragung gelelektrophoretisch getrennter, mit Restriktionsendonukleasen hydrolysierte DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde der Transfer mit 20 x SSC (s. 2.2.2) als Kapillarblot, entsprechend Sambrook et al., 1989, über Nacht durchgeführt. DNA-DNA-Hybridisierungen wurden bei homologen DNA-Fragmenten in Hybridisierungslösung (s. 2.2.2) mit 50% Formamid, 2% Blockingreagenz (Roche Molecular Biochemicals) bei 38-42°C durchgeführt. Hybridisierungen mit heterologen Sonden wurden in Hybridisierungslösung ohne Formamid bei 54-57°C durchgeführt.

Nicht gebundene Sonde wurde anschliessend durch Waschen mit 2 x SSC, 1% SDS bei RT und danach mit 0,5 x SSC, 1% SDS bei 68-70°C entfernt. Für eine niedrigere Stringenz bei heterologen Sonden wurde die Temperatur beim Waschen mit 0,5 x SSC, 1% SDS bis auf 54 °C gesenkt. Die Detektion der DIG-markierten Sonde erfolgte gemäss den Herstellerangabe mit CSPD[®] oder CDP-Star[™] (Roche Molecular Biochemicals) als Substrat für die alkalische Phosphatase. Die entstandene Chemolumineszenz wurde über Röntgenfilme sichtbar gemacht und dokumentiert. Die für DNA-DNA Hybridisierungen eingesetzten DIG-markierten Sonden sind in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Verwendete DIG-markierte DNA-Fragmente für Hybridisierungen

Bezeichnung der Sonde	Gerichtet gegen codierenden Bereich für	Beschreibung/Referenz
1 Gemischte PKS-Sonde	PKS	3 KS-Primeramplifikate <i>S. cellulorum</i> So ce90 und 3 KS-Primeramplifikate <i>St. aurantiaca</i> Sg a15 (Beyer et al., 1999)
2 Gemischte NRPS-Sonde	NRPS	PS-Primeramplifikate aus <i>M. fulvus</i> Mxf85 und <i>S. cellulorum</i> So ce90 (Beyer et al., 1999)
3 Cosmid A2a	L-DOPA-Decarboxylase,	PCR-Amplifikat (Müller et al., 2000)
4 Cosmid A2b	Position 95-434	339 bp PCR-Amplifikat mit Primern Screen 1+2,
5 Cosmid A5	PS-Bereich Contig 11,	425 bp PCR-Amplifikat mit Primern JKB1+2, Position 938-1363
6 Epothilon (Cos8)	PKS	700 bp <i>Bam</i> HI-Fragment aus Cos8
7 Epothilon a	<i>epoA</i>	540 bp PCR-Amplifikat mit Primern JKB11/12 mit chrom. DNA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90
8 Epothilon b	<i>epoE</i>	710 bp PCR-Amplifikat mit Primern JKB13/14 mit chrom. DNA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90
9 Cos6 a	<i>zmaR</i>	360 bp <i>Pvu</i> II-Fragment aus Cos6
10 Cos6 b	Cos6,	650 bp <i>Bam</i> HI-Fragment, Bereich bp 27000-27650
11 Cosmid 66	PKS	780 bp PCR-Fragment mit KS Primern Cosmid 66
12 Cosmid A7	PKS	900 bp <i>Bam</i> HI-Fragment aus Cosmid 71
13 Cosmid A7.	PKS	610 bp PCR-Fragment mit Primern JKB20+21, A7-Bereich mit chrom. DNA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90
14 Cosmid A7.	A7I	599 bp PCR-Amplifikat mit Primern A7I U/D mit chrom. DNA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90

Fortsetzung Tab. 7

Bezeichnung der Sonde	Gerichtet gegen codierenden Bereich für	Beschreibung/Referenz
15. Cosmid A7	A7r	462 bp PCR-Amplifikat mit Primern A7rU/D mit chrom. DNA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90
16 Cosmid 40	Cosmid 40	700 bp <i>Sma</i> I-Fragment
17 Cosmid 40	Cosmid 40	2,3 kb <i>Bam</i> HI-Fragment
18 Cosmid 55	Cosmid 55	1,7 kb <i>Bam</i> HI-Fragment
19 Cosmid 81	Cosmid 81	700 bp <i>Bam</i> HI-Fragment
20 Cosmid 84	Cosmid 84	2,4 kb <i>Bam</i> HI-Fragment
21 Cosmid 91	Cosmid 91 T3-Ende	240 bp PCR-Amplifikat mit Primern JK91U/D mit chrom. DNA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90

2.13 Antibiotikatest gegen Myxobakterien

Die Stämme *St. aurantiaca* DW4/3-1 und *S. cellulorum* So ce90 wurden auf das Wachstum in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Erythromycin und Hygromycin B hin untersucht. Dazu wurde jeweils ein Ansatz in Flüssigmedium und ein Ansatz auf Agarplatten mit den für die Stämme erforderlichen Medien (s. 2.2.1) durchgeführt.

2.13.1 Test in Flüssigmedium

Gut bewachsene Kulturen der beiden Stämme (*St. aurantiaca* DW4/3-1; 1 Tag; *S. cellulorum* So ce90; 5 Tage) dienten für die Experimente als Inokulum. Das Medium wurde in Röhrchen (30 ml) vorgelegt und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums versehen (0-200 µg/ml). Mit der Ausgangskultur wurden die vorbereiteten Medien 10%ig angeimpft (Endvolumen 10 ml) und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Es erfolgte eine tägliche Sichtkontrolle über das Wachstum der Kulturen. Wenn die Kontrolle gut bewachsen war, wurde das Wachstum der Zellen in den unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen mikroskopisch ausgewertet. Alle Ansätze wurden als Doppelansätze durchgeführt und ein weiteres mal wiederholt.

2.13.2 Test auf Agarplatten

Für den Test des Wachstums auf Agarplatten wurden die optimalen Medien für die Myxobakterienstämme verwendet. Im Falle von *S. cellulorum* So ce90 war dies Probion-Agar (s. 2.2.1), im Falle von *St. aurantiaca* DW4/3-1 handelte es sich um Trypton-Agar (s. 2.2.1). Gut bewachsene Vorkulturen dienten hier als Inokulum. Diese Kulturen wurden durch Zentrifugation (5000 g, 5 min.) geerntet, gezählt und in Medium resuspendiert, wobei eine Konzentration von 10^9 Zellen/ml eingestellt wurde. Es wurden je 0,5 ml dieser Zellsuspension auf die vorbereiteten Agarplatten aufgetropft, die unterschiedliche Antibiotikakonzentrationen (0-200 µg/ml) enthielten. In einem weiteren Ansatz wurde 1 ml der Zellsuspension dünn auf den Agar plattiert. Im Falle des Stammes *St. aurantiaca* DW4/3-1 wurde dies mit Top-Agar durchgeführt. Die Agarplatten wurden bei 30 °C bebrütet und täglich auf das Wachstum hin kontrolliert. Der Ansatz mit *St. aurantiaca* DW4/3-1 konnte nach 10 Tagen beendet werden, wenn sich die Kontrolle ohne Antibiotikum dunkel färbt und abstirbt. Im Falle des Stammes *S. cellulorum* So ce90 erfolgte die endgültige Kontrolle erst nach einem Zeitraum von 20-25 Tagen. Alle Ansätze wurden als Doppelansatz durchgeführt und danach ein weiteres mal wiederholt.

2.14 Transformation von Bakterien

2.14.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation der *E. coli*-Stämme DH5α, XL1-Blue, DH10B und ET12567 pUB307 erfolgte über Elektroporation mit einem Bio-Rad „Gene-Pulser“.

Elektroporationsbedingungen waren 25 µF, 1,25 kV (0,1 cm Elektroporationsküvette) oder 2,5 kV (0,2 cm Elektroporationsküvette) bei 200 Ω Widerstand. Elektroporation und Herstellung kompetenter Zellen wurden nach Herstellerprotokoll wie folgt beschrieben, durchgeführt:

1 l-LB-Medium, verteilt in vier 500 ml Schüttelkolben wird mit einer frischen ÜK des entsprechenden *E. coli*-Stammes im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Kulturen werden unter Schütteln bei 37°C bebrütet bis sie eine OD600 von 0,6 bis 0,8 erreichen. Die

Zellen werden 15 min. auf Eis gestellt und bei 4°C in einem kalten Rotor bei 4000 g für 15 min. zentrifugiert.

Der Überstand wird abgegossen und das Zellpellet in 1 l eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend werden die Zellen bei 4°C und 4000 g für 15 min. zentrifugiert.

Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen in 0,5 l eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird in kaltem, 10%igem Glycerin (20 ml) resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Anschließend werden die Zellen, nach Entfernen des Überstandes in ca. 2ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert.

Je 50 µl dieser Zellsuspension wird in 1,5 ml Reagiergefäße aliquotiert und bei -70°C gelagert. Alle Schritte außerhalb der Zentrifuge werden auf Eis bei 4°C durchgeführt.

Für *E. coli* DH10B wurde nachstehendes Protokoll für kompetente Zellen zur Herstellung einer BAC-Klonbibliothek verwendet:

3 ml SOB-Medium werden mit einer Kolonie von *E. coli* DH10B beimpft und als ÜK unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

In einem Verhältnis von 1:1000 wird 1 l SOB-Medium mit der über Nacht gewachsenen Kultur beimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,6 bis 0,8 bebrütet.

Insgesamt 250 ml der bewachsenen Kultur wird in vier 250 ml Zentrifugenbecher überführt und in einem kalten Sorvall GSA Rotor für 10 min. bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert.

Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellpellets in insgesamt 250 ml kaltem Glycerin (10%) resuspendiert und erneut für 10 min. bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert.

Es schließt sich ein erneuter Schritt mit Resuspendieren und Zentrifugieren an.

Anschließend werden die Zellpellets in sehr wenig Überstand resuspendiert und zusammen in ein 50ml Zentrifugengefäß (SS34) überführt. Es schließt sich eine

Zentrifugation in einem SS34 Rotor bei 4°C und 7000 rpm für 10 min. an. Das Pellet wird nach Entfernen des Überstandes in ca. 2ml Glycerin (10%) resuspendiert und in Aliquots von 30 µl in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Die Zellen werden bei -70°C gelagert.

Für Subklonierungen in den Vektor pTOPO wurde das TOPO^{TA}-cloning Kit unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet.

2.14.2 Transformation von *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1

Elektrotransformation von *St. aurantiaca* DW4/3-1 erfolgte nach der bei Plaga et al. (1996) und Beyer et al. (1999) beschriebenen Methode. Dazu wurde eine in Tryptonmedium gewachsene *St. aurantiaca*-Kultur (100-170 ml) (mit 120 µg/ml Streptomycinsulfat) bei 20°C in 50 ml Reagiergefäßen abzentrifugiert (15 min, 5000 rpm). Die Zellen werden im gleichen Volumen 5mM HEPES/NaOH 0,5 mM CaCl₂, pH 7,2 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 25 ml Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in Puffer mit einer Konzentration von $6,8 \times 10^{10}$ Zellen /ml aufgenommen.

5µl DNA und 40µl der Zellsuspension werden gemischt und in die eisgekühlte Küvette (0,1 cm) gegeben. Die Elektroporation wird bei 200 Ω, 25µF und 0,85kV durchgeführt.

Nach der Elektroporation wird 1 ml Tryptonmedium zugegeben. Dieses Volumen wird auf 50 ml erhöht und die Zellen werden für die phänotypische Expression mindestens 18 Stunden bei 32°C unter Schütteln inkubiert.

Die Zellen werden danach abzentrifugiert (15 min., 5000 rpm, 4°C) und in 2 ml Tryptonmedium resuspendiert. Bis zu 1 ml dieser Suspension wird dann auf Tryptonagarselektionsplatten mit Top-Agar ausgebracht. Nach ca. 5-7 Tagen werden erste Kolonien sichtbar.

2.14.3 Triparentale Konjugation von *Sorangium cellulosum* So ce90

Der Helferstamm *E. coli* HB101 RK600 (s. 2.3 Tab. 3) und der das mobilisierbare Inaktivierungsplasmid tragende Donorstamm *E. coli* ET12567 pUB 307 (s. 2.3 Tab. 3) werden als Übernachtskultur bei 37°C unter Zugabe von 25 µg/ml Chloramphenicol zur Selektion in LB-Medium angezogen. Die Selektion auf das Inaktivierungsplasmid in

ET12567 pUB 307 erfolgte durch die Zugabe von Hygromycin B (100 µg/ml). Aliquots der gut bewachsenen ÜK dienten als Inokulum für je 25 ml LB-Medium mit einer Animpfdichte von 1:1000. Auch hier werden die entsprechenden Antibiotika zur Selektion zugegeben. Die Kulturen werden im Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 Min. geerntet. Die Zellen werden zweimal mit frischem LB-Medium gewaschen um Reste der Antibiotika zu entfernen. Nach der letzten Zentrifugation werden die Zellen auf eine Dichte von 10¹⁰ Zellen/ml eingestellt.

Ausgehend von einer 7 Tage alten *S. cellulorum* So ce90 Kultur wird diese mit einer Animpfdichte von 5% in frisches Probionmedium (50 ml) überführt und bei 30°C für 5 Tage inkubiert, bis eine Zelldichte von 5x10⁸ bis 10⁹ Zellen/ml erreicht ist. Die Zellen werden für 10 min. bei Raumtemperatur bei 5000 rpm zentrifugiert und in Probionmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird mit Probionmedium eine Zelldichte von 10⁹ Zellen/ml eingestellt. Je 10¹⁰ Zellen der beiden *E. coli*-Stämme und *S. cellulorum* So ce90 werden vereinigt und erneut bei 5000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird mit Probionmedium (1-2 ml) vorsichtig resuspendiert und auf Probion-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetropft. Die Agarplatten werden für die Konjugation für 40 Stunden bei 32°C oder 37°C bebrütet.

Nach der Konjugation wird das Zellpellet mit Hilfe eines Zellschabers für eukariontischen Zellkulturen von der Agarplatte genommen und in einem Volumen von ca. 2 ml resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wird in Aliquots von 100-300 µl auf Probion-Agarplatten, die 60 µl/ml Hygromycin B und 100 µl/ml Tobramycin enthalten, ausgebracht. Die Selektion auf das Integrationsplasmid erfolgt dabei mit Hygromycin B, die Gegenselektion der *E. coli*-Donorstämme mit Tobramycin.

Erste *S. cellulorum* So ce90 Kolonien sind nach ca. 8-16 Tagen zu sehen. Erhaltene Kolonien werden in Flüssigmedium mit 60 µl/ml Hygromycin B einer weiteren Selektionsrunde unterworfen. Gut bewachsene Kulturen wurden dauerkultiviert und mittels PCR und Southern-Hybridisierung auf das Vorhandensein und den Integrationsort des Inaktivierungsplasmides untersucht. Aliquots dieser Kulturen wurden benutzt, um das Wachstum in Medium mit Hygromycin B, die Produktion von Sekundärmetaboliten zu untersuchen (s. 2.5.2; 2.14; 2.16 und 2.17)

2.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ausgehend von einem Standardprotokoll (Tab.8) wurden die PCR Bedingungen für jedes verwendete Primerpaar optimiert. Vom Standardprotokoll abweichende Bedingungen werden in Abschnitt 3 angegeben. Die Polymerasekettenreaktion wurde in Eppendorf Thermocyclern (Hamburg) durchgeführt.

Tab. 8: Standardprotokoll für PCR

Zusammensetzung eines Standardreaktionsansatzes (25µl) Taq-DNA-Polymerase	
Matrizen-DNA	150 ng chromosomale DNA oder 20 ng Plasmid-DNA
Primer, je	5 pmol
dNTP, je	1,25 nmol
MgCl ₂	1 mM
Polymerasepuffer (10 x)	2,5 µl
DMSO	5-10%
DNA-Polymerase	1U
Aufüllen mit H ₂ O auf 25 µl	

Reaktionsbedingungen:	DNA-Denaturierung	95°C	30 s.
	DNA/DNA-Hybridisierung	50-65°C	25 s.
	DNA-Verlängerung	72°C	30 s.-5 min.

Die Amplifikation erfolgte in 30 Reaktionszyklen. Vor Beginn der Zyklen wurde die DNA 2 min bei 98°C denaturiert. Die Denaturierung betrug 15 min. bei 95°C, wenn für Screening-Ansätze Hot-Start[®]-Taq-Polymerase verwendet wurde. Um die Verlängerung aller Fragmente zu sichern, wurde nach Abschluss der Zyklen noch einmal 10 min bei 72°C inkubiert.

Wurde mittels PCR eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsschnittstelle eingefügt, lag die Hybridisierungstemperatur 5- 10°C unter der Schmelztemperatur des

partiell heterologen Oligonukleotids. Die Verlängerungszeit betrug 1 min/kb Produktlänge.

2.16 Herstellung von Kulturextrakten

Die Herstellung von Kulturextrakten aus Fermentationskulturen von *S. cellulorum* So ce90 erfolgte wie bei Gerth *et al.* (1996) beschrieben. Dazu wurde das XAD-16 durch einen Prozessfilter von der Kulturbühe abgetrennt, mit Wasser nachgewaschen und mit Methanol über Nacht extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde im Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur wässrigen Phase eingengt und diese mit dem doppelten Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetat-Phase wurde im Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockne eingengt und in einem Verhältnis von 1:100 bezogen auf das Kulturvolumen in Methanol aufgenommen.

2.17 HPLC

Zur Untersuchung und Detektion der in der Fermentation gebildeten Produkte aus *S. cellulorum* So ce90 wurden die erhaltenen Kulturextrakte mittels HPLC (HPLC System 1090, Hewlett Packard) mit einem Dioden-Array-Detektor überprüft. Zur Trennung der Metabolite wurde eine Nucleosil® RP 100-3C18 Säule (Macherey Nagel, Düren) benutzt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min bei einer Temperatur von 60°C.

Für die Auftrennung der Methanoleluate wurden zwei unterschiedliche Laufmittelgradienten in dieser Arbeit verwendet:

Der Gradient G1 wurde für die Untersuchungen der Epothilonproduktion aus *S. cellulorum* So ce90 B2 benutzt.

G1 0,2 % Essigsäure (A)/Acetonitril (B)

0 min	25	% B
2 min	30	% B
5 min	40	% B
5,5 min	50	% B
7 min	50	% B
10 min	100	% B
11 min	25	% B
12 min	25	% B

Gradient G2 wurde zur Standarduntersuchung aller Kulturextrakte und für die Untersuchungen zur Spirangienproduktion benutzt.

G2 0,2% Essigsäure (A)/ Methanol (B)

0 min	45% B
20 min	70% B
26 min	70% B
40 min	90% B

Für die HPLC-Untersuchungen wurden 5 µl Injektionsvolumen der Kulturextrakte verwendet. Detektierte Peaks wurden im Falle der Epothilone mit dem Laufverhalten von Vergleichssubstanzen und wie im Fall der Spirangiene über das Absorptionsspektrum identifiziert.

2.18 Massenspektrometrie und NMR

Die Verifizierung der in der HPLC detektierten Substanzen wurde von Herrn Heinrich Steinmetz in der Abteilung Naturstoffe (Prof. Höfle, GBF-Braunschweig) mit den Methoden der HPLC-MS und im Falle des aus der Mutante JKB19 erhaltenen

Spirangiens zusätzlich mit ^1H - und ^{13}C - NMR spektroskopischen Methoden durchgeführt.

2.19 Sequenzierung von DNA

Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten, sowie der rekombinanten Cosmide A6 und A7 aus *S. cellulorum* So ce90 wurden in der Abteilung Genomsequenzierung bei Dr. Helmut Blöcker (GBF-Braunschweig), wie bei Silakowski et al. (1999) beschrieben durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm XGAP (Bonfield et al., 1995) zusammengefügt.

Sequenzierungen von pTOPO-Konstrukten erfolgte mit den Primern M13 forward und reverse, Ansequenzierung von Cosmiden mit T3 und T7 Primern.

2.20 Verwendete Computerprogramme

DNA- sowie Proteinsequenzanalysen wurden mit Hilfe des „DNASTAR“ Programmpaketes (Lasergene inc., Madison, USA) durchgeführt. DNA-Wiederholungssequenzen wurden mit Hilfe von GeneQuest, die DOT-Plot-Darstellung mit Hilfe von Megalign des Programmpaketes untersucht. Zur Auffindung von potentiellen offenen Leserahmen wurde das Programm Frame Plot 2.3 (Ishikawa und Hotta, 1999) benutzt.

Multiple Vergleiche von Proteinsequenzen erfolgten mit dem Programm „ClustalW“ (Thompson et al., 1994). Weitere DNA und Protein-Sequenzvergleiche erfolgten in den Datenbanken von EMBL, SwissProt und Pfam (Bateman et al., 2002) mit den Programmen FASTA (Pearson und Lipman, 1988) und BLAST (NCBI) (Altschul et al., 1997).

3 Ergebnisse

3.1 Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90

Zu Beginn der Arbeit lag bereits eine in *E. coli* angelegte, ca. 1600 Klone umfassende Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90 vor (S. Beyer und R. Müller, unveröffentlicht). Diese Bibliothek wurde über Koloniehybridisierung zur Identifizierung von PKS und NRPS-codierenden Sequenzen durchgemustert (Beyer et al., 1999). Für die Hybridisierung wurden 3 verschiedene DIG-markierte DNA-Fragmente als Sonde eingesetzt. Diese DNA-Sonden stammten aus PCR-Reaktionen genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 mit degenerierten Oligonukleotiden, die spezifisch in KS oder NRPS codierenden Sequenzen hybridisieren (Turgay et al., 1994; Beyer et al., 1999). Aus den Experimenten konnten 106 Klone identifiziert werden, die Signale mit den markierten Sonden zeigten. Dabei hatten 58 Klone nur mit den KS-Sonden, 20 Klone nur mit der NRPS-spezifischen Sonde und 14 Klone mit beiden Sonden hybridisiert. Als Nomenklatur wurden die Klone mit PKS-hybridisierenden Signalen mit den Nummern 1-72, die NRPS-hybridisierenden Klone mit den Nummern 73-106 bezeichnet. Aufgrund der verwendeten Nomenklatur sind die 20 Cosmide, die mit beiden Sonden hybridisierten doppelt vorhanden und bilden identische Cosmide mit unterschiedlichen Nummern (Nr. PKS und Nr. NRPS). Diese 106 rekombinanten Cosmide wurden als Subbank in *E. coli* XL-1blue transformiert und dienten als Ausgangspunkt für die Suche nach Sekundärstoffbiosynthesegenclustern. Die DNA-Sequenz des Cosmids A2 (Nr. 5), welches Signale auf PKS und NRPS codierende Sequenzen zeigte, war zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt. Parallel wurde bei dem damaligen Kooperationspartner Bristol-Meyers-Squibb (BMS, USA) das in Braunschweig identifizierte Cosmid A5 (Nr. 57), sowie die von BMS aus einer anderen Cosmidgenombibliothek stammenden Cosmide Cos 6 und Cos 8 auf der Suche nach dem Epothilombiosynthesegencluster ganz oder teilweise sequenziert. Die Cosmide Cos 6 und Cos 8, die ebenfalls Hinweise auf das Vorhandensein von PKS und NRPS codierenden Sequenzen zeigten, wurden von BMS für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2 Screening der Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90

In der vorliegenden Arbeit sollten die von Beyer und Müller (s.o.) identifizierten, potentiell PKS- und NRPS codierenden rekombinanten Cosmide analysiert werden. Um mögliche Biosynthesegencluster, wie das Epothilon- und das Spirangienbiosynthesegencluster zu identifizieren, die theoretisch mehr als 60 kb an genomischer DNA-Sequenz umfassen, müssen die rekombinanten Cosmide, die nur ca. 40 kb an *S. cellulorum* So ce90 DNA beinhalten zu Contigs (Nachbarn) zusammengestellt werden. Dazu sollten die Cosmide zu Gruppen überlappender Sequenzen zusammengefasst werden.

Die DNA der 106 rekombinanten Cosmide wurde aus *E. coli* isoliert, mit *Bam*HI hydrolysiert, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Membranen fixiert. Die Inserts der rekombinanten Cosmide wurden dann mittels Southern- Hybridisierung untersucht. Für die Hybridisierung wurden DIG-markierte DNA-Fragmente als Sonden verwendet. Im ersten Experiment wurde die gemischte PKS-Sonde (s. 2.12, Tab.7) eingesetzt, die verschiedene KS-PCR-Fragmente von *S. cellulorum* So ce90 und *St. aurantiaca* Sg a15 enthält. Im zweiten Experiment wurde zur Hybridisierung die gemischte PS-Sonde (s. 2.12, Tab.7) verwendet. Die Hybridisierungen wurden mit Formamid bei 39°C durchgeführt. Gewaschen wurde anschliessend bei 60°C (s. 2. 12). Nach der Detektion wurden die Cosmide mit Hilfe des Restriktions- und des Hybridisierungsmusters verglichen. 23 Cosmide zeigten bei den durchgeführten Hybridisierungen keine Signale.

Damit den Cosmiden, über die die Gruppenbezeichnung definiert wurde, überlappende Cosmide zugeordnet werden konnten, wurden anschliessend weitere Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Da es sich dabei um homologe Sonden handelte, wurden die Hybridisierungen unter stringenten Bedingungen, mit Formamid, bei 42°C durchgeführt. Die Waschprozedur erfolgte bei 68°C.

Mit den erhaltenen Hybridisierungsergebnissen konnten insgesamt 8 Gruppen identifiziert werden, die als A2, A5, A7, A8, A9, A10, Cos 6 und Cos 8 bezeichnet wurden (Tab. 9). Die Cosmide Cos 6 und Cos 8, die nicht aus der bearbeiteten Cosmidgenombibliothek stammen (s. 3.1), wurden bei den Hybridisierungsexperimenten mitverwendet. Die Hybridisierungsergebnisse zeigten, dass sich in der untersuchten Cosmidgenombibliothek Cosmide mit deutlichen Überlappungen zu Cos 6

und Cos 8 finden ließen. Diese wurden daher bei den folgenden Experimenten unter diesen Gruppenbezeichnungen weiter mitgeführt.

Tab. 9: Gruppenbezeichnung und repräsentative Cosmide aus der Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90

Cosmidgruppen- Bezeichnung	A2	A5	A7	A8	A9	A10	Cos6	Cos8
Repräsentative Cosmid-Nr	5	57	71	91	40	81	2	54
Hybridisierungs- signale auf	PKS NRPS	PKS NRPS	PKS	NRPS	PKS	PKS NRPS	PKS NRPS	PKS NRPS

PKS Polyketidsynthase; NRPS nicht-ribosomale Polypeptidsynthetase

Mit den im Folgenden beschriebenen Hybridisierungs- und PCR-gestützten Experimenten wurde weiterführend nach Anschlußcosmiden gesucht. Es sollte eine Abschätzung erfolgen, wie viele potentielle Biosynthesegencluster des Typs PKS und/oder NRPS im Genom von *S. cellulorum* So ce90 vorhanden sind. Darüber hinaus sollte das Epothilon- und Spirangienbiosynthesegencluster identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Die Gruppierung des DNA-Bereiches A2 erfolgte unter Verwendung der Sonde 3 (s. 2.12, Tab.7). Die in Tab. 10 angegebenen überlappenden Cosmide zeigten dabei ein einheitliches Hybridisierungsmuster mit den erwarteten Fragmenten. Alle überlappenden Cosmide tragen ORF 8 (PKS) und ORF 9 (NRPS) des Cosmids A2. Weiter wurde unter der Verwendung der Sonde 4 nach Anschlusscosmiden gesucht, die das 5'- oder 3'-Ende von A2 überlappen und zusätzliche PKS- und/oder NRPS-codierenden Gene tragen. Solche Cosmide konnten jedoch nicht entdeckt werden.

Fünf überlappende Cosmide zu A5 wurden mit Hilfe der Sonde 5 (s. 2.12, Tab.7) detektiert. Näheres ist unter 3.4 beschrieben.

Mit A7 wurde eine Gruppe von 12 Cosmiden gefunden, die nur mit PKS-homologen Sonden hybridisierten. A7 und das Anschlusscosmid 66 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenziert und als zusammenhängende DNA-Sequenz von 62 kb dargestellt (s. 3.7). Eine eindeutige Zuordnung zu dem im folgenden A7-Genlocus genannten Sequenz konnte nur für die Cosmide 4, 29 und 48 gezeigt werden. Dazu

wurden mehrere Hybridisierungen mit verschiedenen, von der Sequenz abgeleiteten DNA-Sonden (s. 2.12, Tab.7) sowie Sequenzvergleiche ansequenzierter Cosmide durchgeführt. Die Sequenz der T3-Sequenzierung von Cosmid 48 ergab eine Übereinstimmung zur A7-Sequenz an Position 28535-28000 des A7 Genlocus (s. 3.7). Bei der geschätzten Insertgröße von 40 kb an *S. cellulorum* So ce90 DNA enthält das Cosmid 48 somit rund 12 kb an unbekannter Sequenz. Cosmid 48 überlappt nicht mit den anderen 9 Cosmiden dieser Gruppe.

Tab. 10: Cosmidgruppen und überlappende Cosmide aus der Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90

Cosmidgruppen- bezeichnung	überlappende Cosmide	hybridisierende <i>Bam</i> HI-Fragmente nach -Hydrolyse [kb]	verwendete DNA-Sonde
A2	5, 16, 18, 56/89, 63/97; 68/100/101	0,33; 0,34; 0,48; 0,94	3
A5	57, 47, 87/90	2,8	5
A7	71, 1, 4, 7, 9, 10, 12, 29, 30, 48, 58, 66	4; 6,8 0,9; 6,8; >6,8; 12 6,8; 12	11, 12, 13, 14, 15
A8	91, 38, 72, 86, 88	9	21
A9	40, 17, 55	2,2; 1,7	1; 18
A10	81/33, 39, 82, 83	0,7 und PCR-Analyse (s. 3.8)	19
Cos 6	2, 8, 13, 19, 20, 26, 28, 37, 41, 45/46, 53	>9,5; 0,7	9, 10
Cos 8	54, 6, 14, 21, 22, 34, 35, 51, 64, 65, 91	3,7; 2,4; 6,5; 3,7	6, 7, 8

Durch / getrennte Cosmidnummern bezeichnen identische Cosmide, > größer als; Sonden s. 2.12

Durch Hybridisierungs- und PCR-Experimente, sowie Restriktionsanalyse konnten drei weitere Cosmidgruppen, A8, A9 und A10 gebildet werden. Die weitere Analyse ist unter 3.6 und 3.8 beschrieben.

Mit Cos 6, welches von BMS entdeckt und sequenziert wurde, konnte eine Gruppe von 12 Cosmiden mit PKS und NRPS-codierenden Sequenzen gebildet werden. Alle Cosmide zeigen bei Hybridisierung- und PCR-Experimenten einen deutlichen Überlapp zu der DNA-Sequenz des Genlocus Cos 6, welcher, wie unter 3.5 beschrieben, näher analysiert wurde.

Mit Cos 8, welches ebenfalls von BMS stammt, konnte eine Gruppe von 10 Cosmiden zusammengestellt werden. Unter Verwendung der Hybridisierungssonden 7 und 8, Es zeigte sich, dass die in diesen rekombinanten Cosmiden vorhandene DNA-Sequenz die Epothilonbiosynthesegene [GeneBank Acc. Nr.: AF210843] repräsentieren (s. 3.6).

3.3 Genlocus A2

3.3.1 Analyse der A2 DNA-Sequenz und Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Das Cosmid A2 trägt ca. 38 kb genomischer DNA von *S. cellulosum* So ce90. Der G+C Gehalt beträgt 70 mol%. Auf diesem Abschnitt wurden 16 mögliche offene Leserahmen (ORF) identifiziert. Die Lage der ORFs und die Ähnlichkeiten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abb. 5 und in Tab. 11 dargestellt. ORF6 zeigt Homologie zu einer eukaryontischen L-Dopa Decarboxylase und konnte in der Funktion der Decarboxylierung von Tyrosin zu L-DOPA funktionell bestätigt werden (Müller et al., 2000). Vier offene Leserahmen zeigen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu Regulatoren. Darunter befindet sich ORF1, mit Ähnlichkeit zu einer Serin/Threonin Proteinkinase und ORF 16 mit Homologie zu einem Sensorprotein eines Zweikomponentenregulationssystems. Weitere mögliche Regulatoren finden sich mit ORF 15 und ORF 12, letzterer mit Ähnlichkeit zu ECF-Sigmafaktoren (Lonetto et al., 1994).

Die Aminosäuresequenz des offenen Leserahmen ORF 8 stellt ein Polyketidsynthasemodul dar (s. Abb. 5 und 1.3).

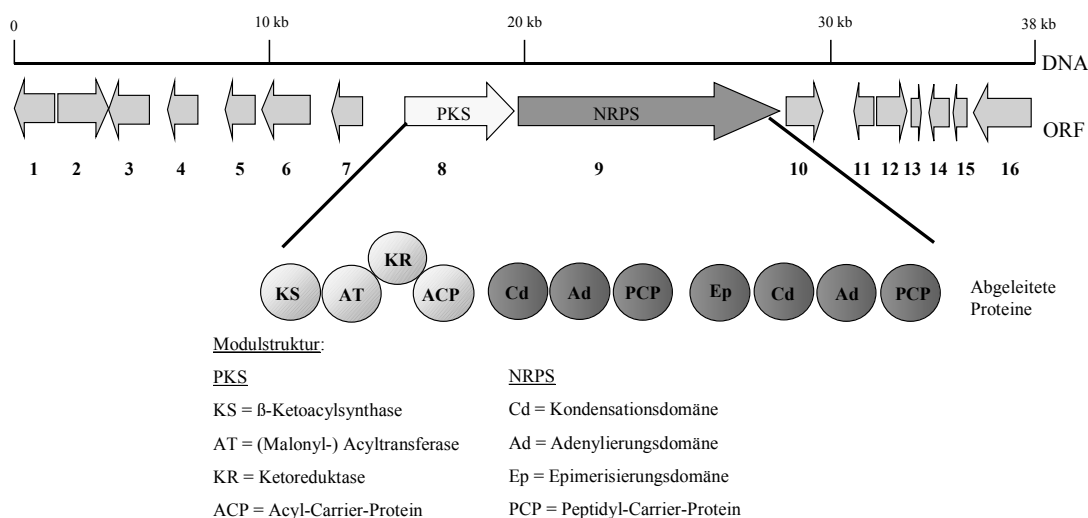


Abb. 5: Genlocus A2 mit möglichen ORFs.

Gezeigt sind die Lage der offenen Leserahmen (ORF) 1-16 und die Domänen der abgeleiteten Proteine von ORF 8 und ORF 9. PKS Polyketidsynthase; NRPS nicht-ribosomale Polypeptidsynthetase.

Die Aminosäuresequenz von ORF 9 beinhaltet zwei Module einer Polypeptidsynthetase. Teilweise erscheinen diese unvollständig, oder möglicherweise inaktiv, da sich z. B. nur Kondensationsmotive C1-C6 des zweiten Moduls statt der beschriebenen Motive 1-7 (Konz et al., 1998) finden lassen. Andere Aminosäuremotive zeigen Abweichungen der beschriebenen Motive (Daten nicht gezeigt). Eine Zuordnung der durch die Adenylierungsdomänen, die einander sehr ähnlich sind (s. 3.3.2) möglicherweise aktivierten Aminosäuren, konnte nicht eindeutig erfolgen. Vergleiche mit bekannten Adenylierungsdomänen lassen Ornithin als Substrat möglich erscheinen (Daten nicht gezeigt). Eine Thioesterasedomäne, die gewöhnlich zur Freisetzung des entstandenen Metaboliten dient, oder ein Lademodul wurde in dieser Sequenz nicht entdeckt.

Tab. 11: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus A2

ORF	5'-[bp]	3'-[bp]	Aminosäuren	Abgeleitetes Protein ist ähnlich zu	Identität/Ähnlichkeit [%]	Organismus
1	1720	1	572	Serin/Threonin-Proteinkinase	39/58	<i>Deinococcus radiodurans</i>
2	1605	3338	577	Hyp. Protein	57/71	<i>Nostoc sp.</i> PCC7120
3	6100	3398	900	Valyl-t-RNA-Synthetase	44/58	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC 2705
4	7111	6374	245	Phenol-Hydroxylase	33/49	<i>Xanthomonas campestris</i>
5	9590	8433	385	Aspartat-Aminotransferase	55/69	<i>Chlorobium tepidum</i>
6	11393	9855	512	L-DOPA-Decarboxylase	38/55	<i>Arabidopsis thaliana</i>
7	13656	12712	314	3-Oxacyl-ACP-Reduktase	43/58	<i>Deinococcus radiodurans</i>
8	15374	19984	1536	PKS	39/57	<i>Nostoc sp.</i>
9	20003	27889	2628	NRPS	40/58	<i>Bacillus cereus</i>
10	28251	29402	383	D-Ala D-Ala Carboxypeptidase	36/55	<i>Bacillus cereus</i>
11	31720	30401	439	Hyp. Protein	32/47	<i>Xanthomonas campestris</i>
12	31982	32932	316	Put. ECF-Sigmafaktor	55/69	<i>Streptomyces avermitilis</i>
13	33128	33613	161	Hyp. Protein	51/66	<i>Mesorhizobium loti</i>
14	33660	34076	138	Hyp. Protein	51/72	<i>Burkholderia fungorum</i>
15	35611	35255	118	Transkriptineller Regulator	80/91	<i>Mesorhizobium loti</i>
16	37856	35730	708	Sensor-Zwei-komponenten-Regulationssystem	56/68	<i>Xanthomonas campestris</i>

Wiedergegeben ist jeweils das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit nach einer Analyse mit BLAST. Put. putativ; hyp. hypothetisch;

3.3.2 Sequenzwiederholungen im Gencluster A2

Die A2 DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Programme GeneQuest und MegAlign aus dem DNA-STAR-Programmpaket auf Sequenzähnlichkeiten hin untersucht. Es konnte

eine Sequenzwiederholung der Adenylierungsdomänen im Bereich der NRPS identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Der Bereich umfasst die Nukleotide bp 21399-23004 und den Bereich bp 26001-27606. Auf der Länge dieser 1606 Basen ergibt sich eine Sequenzübereinstimmung von 96,3%. Dieses Ergebnis deutet auf eine Duplizierung der Adenylierungsdomäne hin.

3.4 Genlocus A5

3.4.1 Analyse der A5 DNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Mit der Sequenzierung von A5, durchgeführt von BMS, wurden drei zusammenhängende DNA-Sequenzen (Contigs) mit der Länge von 9 kb, 18 kb und 16 kb erhalten (Contig 10, 11 und 12), die zusammen 43 kb an genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 darstellen. Die Contigs weisen einen G+C-Gehalt von 70 mol%, 72 mol% und 70,5 mol% auf. Die mit Hilfe von Frame-Plot (s. 2.20) identifizierten offenen Leserahmen der einzelnen Contigs sind in Abb. 6 und in Tab. 12 dargestellt.

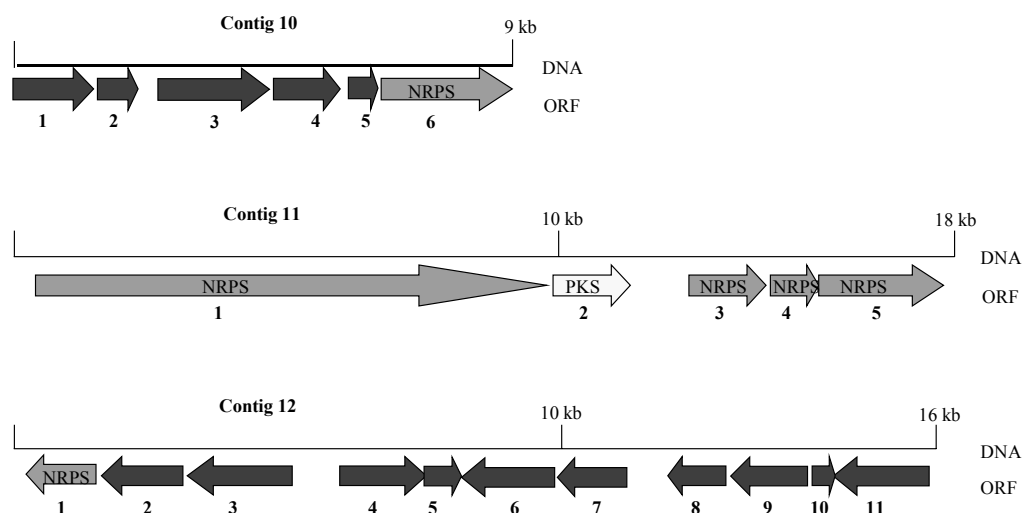


Abb. 6: Genlocus A5 mit möglichen ORFs.

Ähnlichkeiten der abgeleiteten Proteine s. Tabelle 12.

Contig 10 enthält 6 ORFs. Neben hypothetischen Proteinen, die sich aus der Sequenz ableiten lassen, zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF 6 Ähnlichkeit zur

Saframycinsynthetase und könnte damit einen Übergang zu Contig 11 darstellen, an dessen Enden sich weitere NRPS-homologe Proteine finden lassen. Abgeleitete Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu NosA (NRPS). Das abgeleitete Protein der Sequenz von ORF 2 zeigt Ähnlichkeit zu EposC.

Tab. 12: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus A5

contig (bp)	ORF	5'-[bp]	3'-[bp]	Amino- säuren	Abgeleitetes Protein ist homolog zu	Identität/ Ähnlichkeit [%]	Organismus
10 (9435)	1	2	1486	492	Hyp. Protein	25/42	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	2	1702	2301	199	Hyp. Protein	30/52	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
	3	3016	5241	741			
	4	5539	5168	123			
	5	5560	6534	324	Gglycin-rich- protein	67/69	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	6	6575	8854	759	Saframycin	47/60	<i>M. xanthus</i>
11 (18023)	1	707	9934	3075	NosA	31/47	<i>Nostoc sp.</i>
	2	9991	11766	591	EpoC	47/63	<i>S. celluloseum</i> So ce90
	3	12815	14446		NosA	36/52	<i>Nostoc sp.</i>
	4	14454	15524		NRPS	27/37	<i>Streptomyces verticillus</i>
	5	15499	17274		NRPS	45/61	<i>Pseudomonas syringae</i>
12 (15898)	1	1545	1	515	NosA	33/51	<i>Nostoc sp.</i>
	2	2883	1549	444	Cytochrom P450 Oxygenas e		<i>Nostoc sp</i>
	3	4659	2911	582	Eukaryont. Arachidonat- Lipoxygenase	31/46	<i>Mus musculus</i>
	4	5971	7086	371	Hyp. Protein	30/48	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	5	7094	7822	242			
	6	9322	7943	459			

Fortsetzung Tab. 12

contig (bp)	ORF	5'-[bp]	3'-[bp]	Amino- säuren	Abgeleitetes Protein ist homolog zu	Identität/ Ähnlichkeit [%]	Organismus
	7	10742	9732	336	Acetyl-Xylan- Esterase A	30/49	<i>Orpinomyces sp.</i>
	8	12163	11252	281	Hyp. Protein	27/44	<i>M. xanthus</i>
	9	13533	12181	450	Put. Serin/Threonin Proteinkinase	21/28	<i>M. xanthus</i>
	10	13755	14018	87	Hyp. Protein	20/24	<i>S. cellulorum</i> So ce90
	11	15663	13981	560	Put. Serin/Threo- nin Proteinkinase	21/28	<i>M. xanthus</i>

Wiedergegeben ist jeweils das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit nach einer Analyse mit BLAST. Put. putativ; hyp. hypothetisch;

Contig 12 enthält 11 ORFs, wobei ORF 1 Ähnlichkeit zu NRPS (NosA) aufweist. Hier könnte der Übergang zu Contig 11 vermutet werden. Ungewöhnlich ist das Auffinden eines Proteins, das sich von ORF 3 ableiten lässt, da es zu einer Arachidonat-Lipoxygenase der Maus ähnlich ist. Lipoxygenasen gehören zu den Oxidoreduktasen und wandeln ungesättigte Fettsäuren zu offenkettigen Hydroxyperoxy- und Hydroxyfettsäuren um. Die Arachidonat-Lipoxygenase katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure zur 5-Hydroxyperoxyarachidonsäure im Lipoxygenaseweg, der zur Bildung von Leukotrienen führt. Auch ORF 7 zeigt Ähnlichkeit zu einem anderen interessanten Enzym, einer Acetyl-Xylan-Esterase eines Pilzes. Das Enzym wird zum Abbau von Xylan der Hemicellulosen benötigt und ist auch in *Clostridium* und *Streptomyces* zu finden (Kosugi et al., 2002).

Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und PCR wurde versucht, die drei Contigs zu einer durchgehenden DNA-Sequenz zu verbinden (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten, die möglicherweise auf Fehler bei der Sequenzierung und dem Zusammensetzen der erhaltenen DNA-Sequenzen zu den o. g. Contigs zurückzuführen sind. Obwohl viele der erwarteten Fragmentgrößen der Restriktionsanalyse zu erkennen sind, zeigten andere keine zu der Sequenz passenden

Überlappungsfragmente. Auch mittels PCR war es nicht möglich, die Zusammenhänge zwischen den Contigs herzustellen. Da die Sequenzierung bei BMS durchgeführt wurde und die Ergebnisse des untersuchten Genlocus A5 nicht auf das Epothilombiosynthesegencluster deuteten, wurde dieses Cosmid nicht weiter analysiert.

3.5 Genlocus Cos 6

3.5.1 Analyse der Cos 6 DNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Im Rahmen des Screenings nach Biosynthesegenclustern (siehe 3.1) wurde von BMS das Cosmid Cos 6 identifiziert, das deutliche Signale mit PKS und NRPS- Sonden zeigte. Mit der Sequenzierung von Cos6 standen weitere 42 kb an genomischer DNA-Sequenz aus *S. cellulorum* So ce90 für die Suche nach potentiellen Biosynthesegenclustern zur Verfügung.

Auf dem DNA-Fragment konnten 12 ORFs identifiziert werden. Acht der abgeleiteten Proteine zeigen Ähnlichkeit zu Polyketidsynthasen und nicht- ribosomalen Polypeptidsynthetasen. Der G+C-Gehalt von Cos 6 liegt bei 67,3 mol% und liegt damit an der unteren Grenze des typischen G+C-Gehaltes myxobakterieller DNA (siehe 1.1). Die relative Lage der ORFs des Genlocus Cos 6 und der Vergleich der daraus abgeleiteten Proteine sind in Abb. 7 und Tabelle 13 dargestellt.

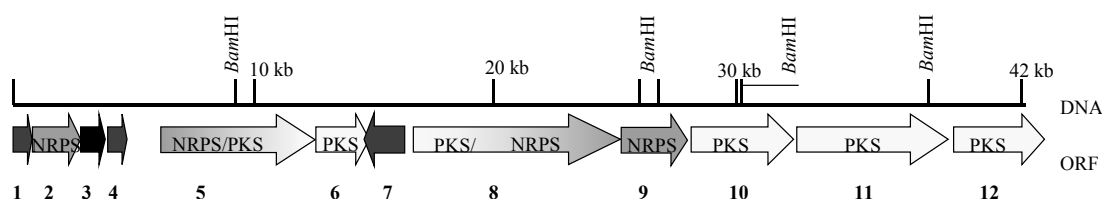


Abb. 7: Genlocus Cos 6 mit möglichen ORFs

Ähnlichkeiten der abgeleiteten Proteine siehe Tabelle 13

Tab. 13: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus Cos6

ORF	5'	3'	Aminosäuren	Abgeleitetes Protein zeigt Ähnlichkeit zu	Identität/Ähnlichkeit [%]	Organismus
1	3	734	243	Acetyl-CoA-Dehydrogenase	40/60	<i>S. cellulosum</i> So ce26
2	731	2278	515	Hurin- SynthetaseA	47/62	<i>Bacillus subtilis</i>
3	2301	3359	352	ZmaR	29/42	<i>B. cereus</i>
4	3412	4053	213	Hyp. Protein	27/38	<i>Sinorhizobium sp.</i>
5	4254	12104	2616	PKS/NRPS	32/47	<i>Pseudomonas syringae</i>
6	12097	14325	742	NosB	42/58	<i>Nostoc sp.</i>
7	15866	14193	557	ISEc8	25/40	<i>E. coli</i>
8	16911	25247	2778	PKS /NRPS	44/61	<i>Nostoc sp.</i>
9	25235	27880	881	MycC	35/53	<i>B. subtilis</i>
10	27867	32501	1544	PKS	33/48	<i>Nostoc sp.</i>
11	32504	39925	2473	NosB	44/60	<i>Nostoc sp.</i>
12	40031	42037	668	PKS	44/61	<i>Nostoc sp.</i>

Wiedergegeben ist jeweils das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit nach einer Analyse mit BLAST. hyp. hypothetisch;

Aus den Vergleichen der abgeleiteten Proteine geht hervor, dass es sich bei Cos 6 um einen DNA-Bereich handelt, der einen Teil eines gemischten PKS/NRPS-Genclusters darstellt. Ungewöhnlich erscheint die isolierte Lage von ORF 2, dessen Translationsprodukt Ähnlichkeit zu NRPS zeigt und durch zwei ORFs (ORF 3 und 4) von der weiteren PKS/NRPS-ähnlichen Clustersequenz abgetrennt ist. Auf der gesamten Aminosäuresequenz der aus den offenen Leserahmen abgeleiteten Proteinen mit Ähnlichkeit zu PKS oder NRPS lassen sich keine eindeutigen Aminosäuremotive finden, die für die jeweilige Enzymaktivität (Motive NRPS nach Konz et al., 1998; Motive PKS nach Tang et al., 1998) verantwortlich sein könnten. Ein modulärer Aufbau ist somit in der Analyse nicht darzustellen. ORF 3 ist ein Gen, das Ähnlichkeit zum Resistenzgen *zmaR* aus *Bacillus cereus* zeigt (s. 3.5.3). ORF 6 und 8 sind durch den ORF 7 unterbrochen, der in umgekehrter Orientierung zu den beiden offenen Leserahmen identifiziert werden konnte. In der BLAST-Abfrage zeigte ORF 7

Ähnlichkeit zu einer Transposase aus *E. coli* (s. 3.5.2). Die Gene der ORFs 3 und 7 sollen folgend näher betrachtet werden (s. 3.5.2 und 3.5.3).

3.5.2 Analyse des IS-Elementes

ORF 7 zeigt in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu einer Transposase eines IS-Elementes aus *E. coli* (Perna et al., 2001). Bei weiterer Analyse der Sequenz konnten die für ein IS-Element typischen „Inverted Repeats“, die palindromischen Sequenzwiederholungen des IS-Elementes, detektiert werden. Mit Hilfe des Programmes GeneQuest wurde die Sequenz 5'-GCGGGTGCGCG-3' identifiziert. Sie ist 11 bp lang und in der Sequenz von Cos 6 an den Positionen bp 14284 und palindromisch bei bp 16572 zu finden. Wie in Abb. 8 dargestellt, sind die „Inverted Repeats“ von einem „Direct Repeat“ der Sequenz 5'-TCGACGA-3' umgeben.

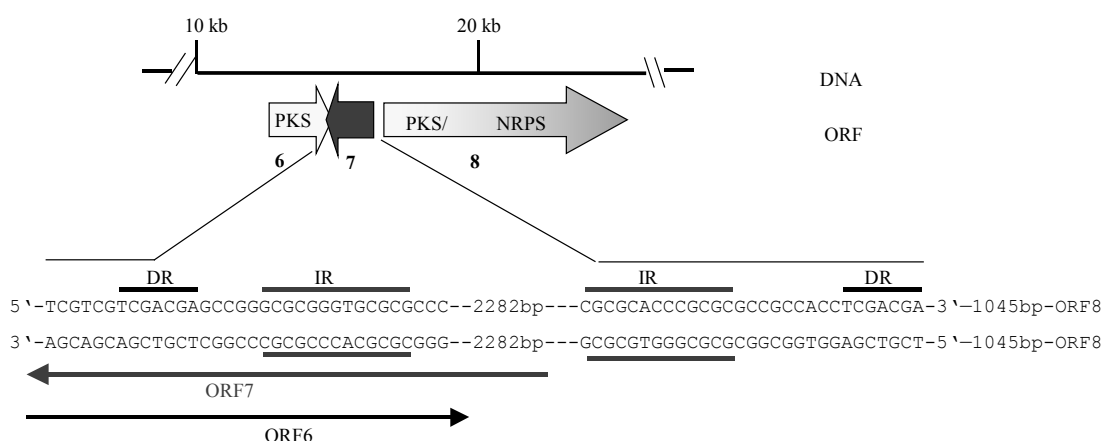


Abb. 8: Analyse des ORF 7 im Genlocus Cos6.

Gezeigt sind die Lage der ORFs 6, 7 und 8, sowie die Basenabfolge und Entfernungen der Inverted und Direct Repeats. ORF offener Leserahmen; IR Inverted Repeat; DR Direct Repeat

Der Leserahmen ORF 6 bricht nach weiteren 30 Nukleotiden ab und würde für ein Protein von 742 Aminosäuren codieren. Auffällig ist dabei, dass der Leserahmen von ORF 7 noch 77 Basenpaare in ORF 6 hineinreicht. Bei Entfernen des IS-Elementes und eines Direct Repeat würde sich der Leserahmen ORF 6 verlängern und für ein Protein aus 810 Aminosäuren codieren. ORF 6 und ORF 8 wären dann nur 59 Basen statt 2586 Basen voneinander entfernt. Um zu klären, ob dieses IS-Element im Genom von *S. cellulosum* So ce90 vorkommt, oder während des Anlegens der Cosmidgenbibliothek

oder der Sequenzierungen entstanden ist, wurde die Gesamt-DNA des Stammes mit Hilfe der PCR untersucht.

Unter Verwendung der Oligonukleotide JKB 42/JKB 43 und JKB 58/JKB 59 (siehe Tab. 7), welche zu beiden Seiten der Insertionssequenz in ORF 6 und ORF 8 hybridisieren, konnte sowohl mit der Positivkontrolle (Cosmid Cos 6), als auch mit genomischer DNA von *S. cellulosum* So ce90 ein Amplifikat der erwarteten Größe von 1,8 kb erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Die Hybridisierungstemperatur der durchgeführten PCR-Reaktion lag bei 60°C und es wurden 10% DMSO im Ansatz verwendet. Die Elongationszeit betrug 3 min (s. Tab. 8). Damit konnte gezeigt werden, dass das transposable Element im Genom von *S. cellulosum* So ce90 vorhanden ist.

3.5.3 *S. cellulosum* So ce90 besitzt ein *zmaR*-orthologes Gen

Das abgeleitete Protein des offenen Leserahmen ORF 3 zeigt mit 29 % Identität und 42 % Ähnlichkeit im BLAST-Vergleich Ähnlichkeit zur Zwittermicin A Resistenz *ZmaR* aus *Bacillus cereus* (Stohl et al., 1999a; GeneBank Acc. Nr.:Q45088). In der Gattung *Bacillus* ist das Resistenzgen weit verbreitet, wobei die Funktion der Resistenz wahrscheinlich in einer Inaktivierung des Polyolantibiotikums Zwittermicin A durch Acetylierung zu finden ist (Stohl et al., 1999b). Die mögliche Funktion des Genproduktes von ORF 3 als Acetyltransferase wird durch einen BLAST-Vergleich mit *ZmaR*, wie in Abb. 9 gezeigt, bestätigt. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von ORF 3 mit weiteren Acetyltransferasen wurde nicht dargestellt. Eine Überprüfung der Funktionalität des ORFs wurde nicht durchgeführt, da u. a. Zwittermicin als Substrat für einen Enzymtest nicht zur Verfügung stand.

	10	20	30	40	50
ORF 3	MLHPIPTDRFALSRLPFRGYLAHDPIVQGVLAGDHPGWVLVDREPEPRTALLWAFSDR				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	MIYELVKEKDAFKQISPLLVDYKNH-PILNGIAHGYNKGHIYVDNPNPNRCALVWAEQEI				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
ORF 3	LFCVGAADTLTPHALAELFHDRLIPQARKIGQPFFQVQGETVDTWS----				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	FYLLGDPTSNEFVSSLPFTFIKEVIAPEAEQIGDDFFQVELLPESKWKQVVEEQLMFIPKP				
	60	70	80	90	100
	120	130	140	150	160
ORF 3	TVSFRQAFRFDRDLFERL--PTKPELAEARLVPIDARLLAEQADLRERILASWSSEAAFH				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	YT--RVTFTFDPESYNKLSKPNMPEEVTVERITIDMLSDKKFAMVRDDIVDFWESTQDFI				
	120	130	140	150	160
	180	190	200	210	220
ORF 3	ARGFGFCYRVGDQLPSVCLASHVGGGAAELSENT-ELEARNRGMATRLCRRFIAESLQRG				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	QNGFGYVVMVHEQVVTSCLSVFATDTEVEIGINTYDLFQRGKYAWLAARAFLLDCLKQG				
	180	190	200	210	220
	240	250	260	270	280
ORF 3	LTPCWGTETFRLPISIALAQKLGFIPTFTFTYCFATGTEQPDNLFGLYRESRIAGSGT				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	RTPHWKTEDFRIPSIKLAGKVGFTNLQTYTAYVFPYNEL---DNFIFTAYHQLRYYSNFN				
	240	250	260	270	280
	300	310	320	330	
ORF 3	DEPQAVRLAR-----GWSLAGDTERAASFAARALAEGWAGHSTLATDPDF				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	KASEFVQKARTIGDLNAAWHHLLSCGYSLIDRIDLSLKHMNLALDLGWNDVSDIRYVVDL				
	300	310	320	330	340
	340	350			
ORF 3	ARLRASAAWPRNLNP				
	:	:	:	:	:
ZmaR:	VNLRKTEEGRALLDREVDSL				
	360	370			

Abb. 9: BLAST- Vergleich der Proteinsequenz von ORF 3 mit ZmaR.

. ähnliche Aminosäuren; : identische Aminosäuren

Da ein solches, bei Bodenbakterien verbreitetes Resistenzgen bisher nicht in Myxobakterien beschrieben ist, sollte untersucht werden, ob solche Acetyltransferasen-codierenden Gene auch in anderen Myxobakterien-Stämmen vorkommen. Zur Klärung der Frage wurde der DNA-Abschnitt des ORF 3 über PCR mit den Oligonukleotiden Cos6U/D (s. 2.4, Tab. 6) amplifiziert und als DNA-Hybridisierungssonde (s. 2.12; Nr. 23, Tab. 7) gegen genomische DNA unterschiedlicher Myxobakterien verwendet. Untersucht wurden die Stämme *S. cellulorum* So ce90, *S. cellulorum* So ce10, *S. cellulorum* So ce12, *S. cellulorum* So ce1525, *St. aurantiaca* DW 4/3-1, *St. aurantiaca* Pde 68, *St. aurantiaca* S ga15 und *Archangium gephyra* Ar 7747.

Die Hybridisierung wurde zuerst stringent bei 42°C und in einem weiteren Experiment mit geringer Stringenz bei 38°C unter Verwendung einer formamidhaltigen Hybridisierungslösung durchgeführt (s. 2.2.2 und 2.12). Als Ergebnis der

Hybridisierung konnte nur ein Signal mit genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 erhalten werden. Scheinbar ist dieses Gen in Myxobakterien nicht weit verbreitet.

3.6 Genlocus Cos8

3.6.1 Identifizierung des Genlocus' Cos 8 als Epothilonbiosynthesegencluster

Mit Veröffentlichung der Epothilonbiosynthesegene (Molnar et al., 2000; Julien et al., 2000; s. 1.8) konnten Oligonukleotide vom 5'- (s. 2.12; *epoA*-Sonde Nr. 7, Tab. 7) und 3'-Ende (s. 2.12; *epoE*-Sonde Nr. 8, Tab. 7) des Genclusters abgeleitet werden, um die in der Cosmidgenbibliothek korrespondierenden Cosmide zu identifizieren. Mit den Primern JKB10/11 und JKB12/13 (s. 2.4, Tab. 6) wurde eine PCR mit genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C durchgeführt. Die mit der PCR-Reaktion erhaltenen Fragmente (*epoA* 540 bp; *epoE* 710 bp) wurden anschliessend DIG- markiert und als Sonden (s. 2.12; Nr. 7 und 8, Tab. 7) für DNA/DNA-Hybridisierungsexperimente gegen die Cosmidgenbibliothek (s. 3.1 und 3.2) verwendet. Die Hybridisierung mit dem Fragment aus dem Bereich *epoA*, (Hybridisierungssignale bei 2,4 kb und 3,7 kb nach Hydrolyse mit *Bam*HI) zeigte Cosmide der Cos8 Gruppe an. Unter der Verwendung der Sonde 8 (s. 2.12) wurde diese Gruppe vervollständigt (s. 3.2, Tab. 10). Demzufolge repräsentieren die rekombinanten Cosmide der Cos8-Gruppe das Epothilonbiosynthesegencluster.

3.6.2 Identifizierung eines zu Cos 8 benachbarten NRPS- Genclusters

Hybridisierungsexperimente mit den DNA-Sonden aus den Bereichen *epoA* und *epoE* zeigten, dass die Cosmide 14, 21 und 91 mit dem 5'-Ende des von Molnar et al. publizierten Epothilonbiosynthesegenclusters (Molnar et al., 2000, GeneBank Acc. Nr.: AF210843) überlappen. Im Gegensatz zu den Cosmiden 14 und 21 zeigte das Cosmid 91 beim Screening unter Verwendung der NRPS-Hybridisierungssonde 2 (s. 2.12, Tab. 7) ein unterschiedliches Hybridisierungsmuster. Da die Größe der hybridisierenden Banden und ein *Bam*HI-Restriktionsvergleich das Vorhandensein von *epoP* bei Cosmid91 ausschloss, durfte vermutet werden, dass weitere NRPS-codierende Gene benachbart zum 5'-Ende des Epothilonbiosynthesegenclusters liegen.

Mit Hilfe des Oligonukleotidpaares JKB15/16 (s. 2.4, Tab. 6), die das äußerste 5'-Ende der von Molnar et al. publizierten DNA-Sequenz abdecken (bp 160-640) wurde eine Sonde zur Identifizierung Cosmid 91 überlappender Cosmide angefertigt, wodurch zusätzlich zu 14 und 21 das Cosmid 88 detektiert wurde. Daraufhin wurden das 5'-Ende und das 3'-Ende von Cosmid 91 ansequenziert. Die von T7-Sequenzierprimern ausgehende Sequenz war identisch mit der von Molnar et al. (2000) publizierten *epoA* Sequenz, während das von T3-Sequenzierprimern ausgehende Ende eine unbekannte Sequenz aufwies. Die von diesem Ende abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Ähnlichkeit zu anderen NRPS. Mit dem von dieser Sequenz abgeleiteten Oligonukleotidpaar JK91U und JK91D (s. 2.4, Tab. 6) konnte das o. g. Hybridisierungsergebnis bestätigt werden. Nur mit den Cosmiden 91 und 88 wurde ein Amplifikat in der Größe von 280 bp erhalten.

Um weitere überlappende Cosmide zu Cosmid 91 zu finden, wurde mittels der schon im Primärscreening eingesetzten degenerierten NRPS-Oligonukleotide (Beyer et al., 1999) und einer daraus generierten Hybridisierungssonde zusätzlich zu Cosmid 88 die Cosmide 38 und 86 gefunden. Diese Cosmide wurden zusammen mit Cosmid 72 schon zuvor als zusammengehörende, NRPS-Gene enthaltene Gruppe identifiziert (Daten nicht gezeigt). Am 5'-Ende des publizierten Epothilonbiosynthesegenclusters liegt somit ein NRPS-codierender DNA-Abschnitt, der durch die Cosmide 91, 88, 86, 72 und 38 abgebildet wird (s. Abb. 10).

Dieses Ergebnis wurde durch Pulsfeldgelelektrophorese mit *SspI* und *SpeI* hydrolysierter genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 und anschließender Hybridisierung mit Sonden aus dem Bereich *epoE* (s. 2.12; Sonde 8, Tab. 7) und 91-T3-Ende (s. 2.12; Sonde 21, Tab. 7) bestätigt. Die Sonden hybridisierten dabei auf demselben *SpeI*-Fragment von ca. 950 Mb (Frank Gebhard und Jens Knauber, unveröffentlicht).

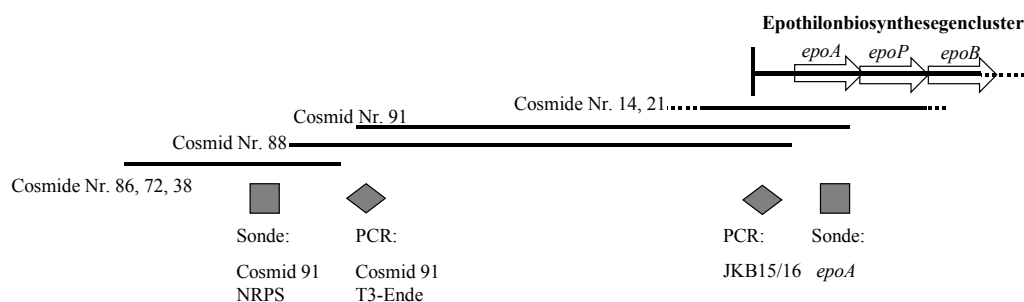


Abb. 10: Relative Lage der überlappenden Cosmide des Bereichs von Cosmid 91

Quadrate zeigen hybridisierende Sonden an, die Rauten die PCR-Experimente mit den Oligonukleotiden JKB15/16 und JK91U/D

3.7 Genlocus A7

3.7.1 Analyse der A7 DNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Auf der Suche nach weiteren möglichen Genclusterbereichen wurde das Cosmid A7 (Nr. 71; Tab. 9), das bei den durchgeführten Hybridisierungen nur Signale auf PKS-codierende Sequenzen gezeigt hatten (s. 3.2), sequenziert. Ebenfalls sequenziert wurde das Cosmid 66, das möglicherweise ein Anschlußcosmid zu A7 darstellt. Über die Sequenzierung der beiden rekombinanten Cosmide A7 und A6 konnten bei einem Überlapp von 20 kb insgesamt 62 kb an zusammenhängender Sequenz erhalten werden. Dieser DNA-Abschnitt weist einen G+C-Gehalt von 73,5 mol% auf und enthält 15 vollständige und einen unvollständigen offenen Leserahmen. Abgeleitete Proteine der ersten vier offenen Leserahmen (ORF 1-4) zeigen bei einem BLAST-Vergleich hohe Ähnlichkeit mit bekannten Polyketidsynthasen. Die Translationsprodukte der offenen Leserahmen 5-7 zeigen Ähnlichkeit zu einer O-Methyltransferase, einer Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenase und einem regulatorischen Protein. Die aus den durchgeführten Vergleichen erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 11 und Tabelle 14 aufgeführt.

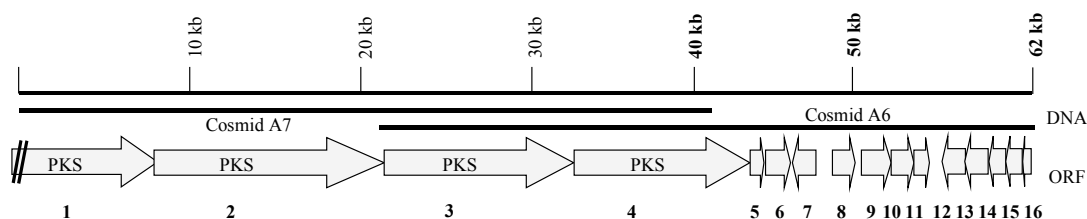


Abb. 11: Genlocus A7 mit möglichen ORFs und Lage der Cosmide A6 und A7.

Ähnlichkeiten der abgeleiteten Proteine siehe Tab. 14.

Tab. 14: ORFs und Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Genlocus A7

ORF	5' [bp]	3' [bp]	Aminosäuren	Abgeleitetes Protein ist ähnlich zu	Identität/ Ähnlichkeit [%]	Organismus
1	2	7558	2518	Soraphen B	61/73	<i>S. cellulosum</i> So ce26
2	7542	22595	5017	Soraphen A	55/67	<i>S. cellulosum</i> So ce26
3	22592	33133	3513	Soraphen B	55/67	<i>S. cellulosum</i> So ce26
4	33126	43865	3579	Amph C	51/63	<i>Streptomyces nodosus</i>
5	43945	44736	263	Put. Methyltransferase	36/57	<i>Anabaena</i> sp.
6	44848	46219	456	Cytochrom -P450 Oxygenase	37/60	<i>Nostoc</i> PCC 7120
7	47060	46302	252	CarQ	35/50	<i>M. xanthus</i>
8	48584	49584	433	-		
9	51466	53174	569	-		
10	53195	54820	541	-		
11	54860	55789	309	-		
12	58285	56762	507	Permease	33/53	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
13	59772	58312	486	PqqE	53/69	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
14	60481	59780	233	PqqC/D	50/67	<i>Methylobacterium extorquens</i>
15	61395	60477	305	PqqB	40/54	<i>Pseudomonas putida</i>
16	62012	61988	8	PqqA	20/21	<i>Pseudomonas putida</i>

Wiedergegeben ist jeweils das Protein mit der höchsten Ähnlichkeit nach einer Analyse mit BLAST.-
keine signifikante Ähnlichkeit; Put. putativ.

Stromabwärts finden sich vier weitere Leserahmen (ORF 8-11), deren Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen zeigt. Dieser Bereich wird auch im Genom von *S. cellulorum* So ce56 gefunden, welches während dieser Arbeiten vollständig sequenziert wurde (S. Beyer, pers. Mitteilung, Gerth et al., 2003).

Am 3'-Ende der Sequenz befinden sich fünf offene Leserahmen (ORF 12-16), deren abgeleitete Proteinsequenzen Ähnlichkeit zu Proteinen der Biosynthese (Pqq A-E) und dem Export (Permease) des Moleküls Pyrrolo-Chinolin-Chinon (PQQ) zeigen (Oubrie et al., 2000). PQQ wird auch in anderen Gram-negativen Bakterien (*Methanococcus*, *Pseudomonas*) gefunden und dient als Cofaktor für Chinonproteine, wie Alkoholdehydrogenasen oder lösliche Glucosedehydrogenasen (Oubrie et al., 2000). PQQ, das für seine Funktion als Cofaktor in das Periplasma ausgeschleust wird, wurde in Myxobakterien bisher nicht gefunden.

3.7.2 Analyse der ORFs 1 bis 4

Die Detailanalyse von 48 kb der A7 DNA-Sequenz wie in Abb. 12 dargestellt zeigt, dass die abgeleiteten Proteine der ersten vier offenen Leserahmen (*spiG-spiJ*, s. Tab. 14) Ähnlichkeit zu modularen Polyketidsynthasen, z. B. zu Proteinen der Soraphensynthase aus *S. cellulorum* So ce26 (Schupp et al., 1995) zeigen. Ein Vergleich zu bekannten Polyketidsynthasedomänen führt zur Identifizierung von acht vollständigen und einem unvollständigen Modul. Diese sind für den Einbau und die Elongation von Methylmalonyl- bzw. Malonyl-Einheiten verantwortlich. In den Modulen konnten die einzelnen Domänen durch Vergleiche mit publizierten Aminosäuremotiven identifiziert werden (Molnar et al., 2000; Tang et al., 1998). Die identifizierten Domänen sind in Tab. 15 und der Abb. 12 dargestellt. Das Vorhandensein und die Anordnung der einzelnen Domänen lassen darauf schließen, dass die ORFs 1-4 einen Teil der Spirangiensynthase codieren (s. Abschnitt 4.). Sie werden im Folgenden deshalb mit *spi* bezeichnet.

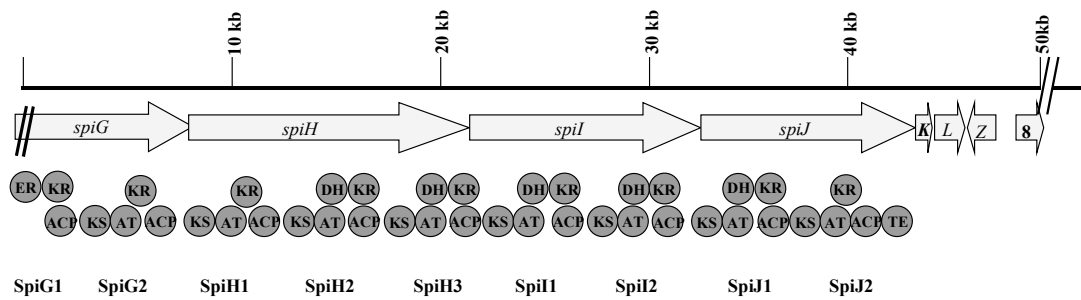


Abb. 12: Modulaufbau des *spi*- Genclusters und Anordnung der Gene für modifizierende Enzyme sowie des Regulorgens *spiZ*.

Analyse und Abkürzungen s. Tab. 15

Mit Beginn der Sequenz des Cosmids A7 lässt sich das erste Protein SpiG ableiten, welches aufgrund noch nicht identifizierter Sequenzinformationen, Stromaufwärts von *spiG*, unvollständig ist. Es lässt sich ein Teil des Moduls mit einer ER, KR und einem ACP ableiten. Das zweite Modul beinhaltet eine KS, AT, KR und ACP. In SpiH lassen sich drei Module identifizieren. Zusätzlich konnten drei KR- und zwei DH-Domänen identifiziert werden, die das entstandene Keton reduzieren. Auch in SpiI finden sich zwei Module. Aus der abgeleiteten Proteinsequenz von *spiJ* lassen sich zwei weitere PKS-Module bestimmen. Im zweiten Modul (SpiJ2) findet sich eine TE-Domäne, an der der entstandene Metabolit freigesetzt werden könnte und somit das Ende einer Polyketidsynthese darstellt (s. Tab. 15).

Tab. 15: Spirangisynthasemodule, abgeleitet aus den Genen *spiG* bis *spiJ*

Gen/ Modul	Domäne/ Funktion	Position [bp]	Codons Aminosäuren	Konserviertes AA-Sequenz-Motiv
<i>spiG</i>		2-7558	2518	
SpiG1	ER	647-1516	290	GGVGIAAVQ
	KR	1541-2293	251	GTGTLGALVA
	ACP	2471-2486		LGLDS
SpiG2	KS	2672-3943	424	DTACSSSL
	AT	4280-5242	321	GHSQG
	spacer		320	

Fortsetzung Tab. 15

Gen/ Modul	Domäne/ Funktion	Position [bp]	Codons Amino- säuren	Konserviertes AA-Sequenz-Motiv
spiH	KR	6203-6943	247	GTGALGAHVA
	ACP	7160-7174		LGLDS
		7542-22595	5017	
SpiH1	KS	7647-8924	426	DTACSSSL
	AT	9249-10211	321	GHSQG
	spacer		310	
SpiH2	KR	11172-11909	246	GTGALGAHVA
	ACP	12105-12119		LGLDS
	KS	12306-13583	426	DTACSSSL
	AT	13908-14879	324	GHSVG
	DH	14907-15509	201	GEDHLSALATLLP
	Spacer		107	
SpiH3	KR	15831-16574	248	GTGALGAHVA
	ACP	16788-16802		LGLDS
	KS	16995-18272	426	DTACSSSL
	AT	18591-19565	325	GHSIG
	DH	19596-20204	203	LADHSVYGRIVVP
	Spacer		356	
	KR	21273-22019	249	GTGTLGALVA
	ACP	22209-22223		LGLDS
		22592-33133	3513	
SpiI1	KS	22703-23974	424	DTACSSSL
	AT	24308-25291	328	GHSIG
	DH	25319-25900	194	DADHRAAWATLVP
	Spacer		115	
	KR	26246-26992	249	GTGALGAHVA

Fortsetzung Tab. 15

Gen/ Modul	Domäne/ Funktion	Position [bp]	Codons Amino- säuren	Konserviertes AA-Sequenz-Motiv
	ACP	27191-27205		SGLDS
SpiI2	KS	27401-28678	426	DTACSSS
	AT	29027-30004	326	GHSIG
	DH	30032-30658	209	LADHSVYGRIVVP
	Spacer		361	
	KR	31742-32491	250	GTGTLGALVA
	ACP	32678-32692		LGLDS
spiJ		33126-43865	3579	
SpiJ1	KS	33228-34496	423	DTACSSSL
	AT	34830-35813	328	GHSIG
	DH	35841-36440	200	LEGHSVFGAPILP
	Spacer		345	
	KR	37476-38219	248	GTGALGAHVA
	ACP	38409-38423		LGLDS
SpiJ2	KS	38604-39872	423	DTACSSSL
	AT	40197-41176	327	GHSIG
	Spacer		260	
	KR	41960-42698	246	GTGTLGGAIA
	ACP	42873-42887		LGLDS
	TE	43142-43852	237	PGSH

Die Identifizierung der konservierten AA- Motive der aufgeführten Domänen erfolgte nach Tang et al. (1998) und Molnar et al. (2000). KS: DtaCSSL; AT: GHSXG; ACP: XGfDS; DH: H(X₃)G(X₄)A oder H(X₃)D(X₄)P; KR: GXGXXG(X₃)A; ER: GGVGXAAAXQ. Verwendet wurde hier der Buchstabencode für Aminosäuren, X ist eine beliebige Aminosäure. Verwendete Abkürzungen: AA Aminosäuren; ACP Acyl-Carrier-Protein; AT Acyltransferase; DH Dehydratase; ER Enoylreduktase; KS β -Ketoacyl-Synthase; KR Ketoreduktase; TE Thioesterase.

Neben der Bestimmung der wahrscheinlichen Funktion, die durch die Identifizierung beschriebener Aminosäuremotive erfolgte, wurden zusätzlich die AT-Domänen im Sequenzvergleich untersucht. Diese lassen sich nach Haydock et al. (1995) und August

et al. (1998) in ihrer Spezifität für den Einbau von Malonat oder von größeren Bausteinen, z. B. Methylmalonat unterteilen.. In Abb. 13 ist der Vergleich der in der Sequenz detektierten AT-Domänen gezeigt. Dabei scheinen die AT-Domänen von SpiG2 und SpiH1 für den Einbau Methylmalonat, alle anderen Malonat zu verwenden.

ATp con	RVDVV	M S A W		GHSQG*
AT SpiG2	RVDVVQPVL	AVMIALAATW	RAAGVTPDAV	VGHSQG
AT SpiH1	RVDVVQPVL	AVMVALAALW	RSIGVTPDAV	VGHSQG
AT SpiH2	RTEFTQPALF	ALEVALFRLV	EAWGVTPDVL	LGHSVG
AT SpiI1	ETLFTQPALF	ALEVALFRLV	EACGLRPDAL	LGHSIG
AT SpiH3	ETLYTQTSLF	ALEVALFRLV	EAWGVTPHVL	LGHSIG
AT SpiJ1	ETLFTQPALF	ALEVALFRLV	EACGLRPDAL	LGHSIG
AT SpiJ2	ETLFTQPALF	ALEVALFRLV	EACGLRPDAL	LGHSIG
ATa con	ETGYA	Q A FGLL		GHSVG
			oder	I
			oder	L

Abb. 13: Sequenzvergleich der Substratspezifität der AT-Domänen des A7-Genlocus.

. Übereinstimmende Aminosäuren sind grau unterlegt. ATp con konserviertes Motiv der AT- Domäne für den Einbau von Methylmalonat, ATa con konserviertes Motiv der AT- Domäne für den Einbau von Malonat. Motive Ata con und Atp con nach August et al. (1998). Das an der Katalyse direkt beteiligte Serin ist durch * gekennzeichnet.

3.7.3 Analyse von *spiK*

Das aus dem offenen Leserahmen *spiK* (Position 43945 bp-44763 bp) abgeleitete Protein (s. Abb. 12 und Tab. 16), zeigt 33 % Identität und 49 % Ähnlichkeit zu einer O-Methyltransferase aus *Microcystis aeruginosa* (s. Abb. 14). Es weist die konservierten Aminosäuresequenzmotive auf, die für die Aktivität und die ATP-Bindestelle beschrieben sind (Kagan und Clarke, 1994).

Tab. 16: Analyse der Gene *spiK*, *spiL*, *spiZ* und der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Gen	Funktion	Position [bp]	Größe Aminosäuren	Konserviertes AA-Sequenz- Motiv
<i>spiK</i>	O-Methyltransferase	43945-44763	263	VLDVAFGKG, ESFDAILC, MLRPSGVLVM
<i>spiL</i>	Cytochrom P-450 Monooxygenase	44849-46219	456	FGGGLRKCIG
<i>spiZ</i>	Regulator	47060-46302	252	EDL(L/V)QXT

Konservierte AA- Sequenzmotive: O-Methyltransferase nach Kagan und Clarke (1994); Cytochrom P450-Monooxygenase nach PROSITE PDOC00081;ECF-Sigma_Faktor nach Lonetto et al. (1994)
Verwendet wurde der Buchstabencode für Aminosäuren. AA Aminosäuren

SpiK: 2	SQIAKAYGHVMRDPAYEQFAGGYVNYGLWTSATKSPAACHHLVDLTL--FAKLPERGRVL 59
McyJ: 12	TNIAKRDPH-LQDPNFPQ----WLNFGYWKEETTYNG-ACAALARKLAELVAGDHLL 65
SpiK: 60	DVAFGKGVSTKRLEERYGAENVAGINIDADQVQIARER----GVT--CDLRVMDAAKPDF 113
McyJ: 66	DVGFGFAEQDLLWVRENNVSSIIGLNTTELQVEIAQERVAKAGLSDRIKLQVGSATQIPF 125
SpiK: 114	PSESFDAILCIESAFHFQSRQAFLAEAHMLRPSGVLVMSDILFRTGHGLD 164
McyJ: 126	PENSFDKLTALECAHFHFDTRDFFAEAFRVLPQGGRLAVADCLPRVGREIN 176

Abb. 14: Vergleich von SpiK und McyJ.

Konservierte Aminosäure-Motive (s. Tab. 16) sind überstrichen. Das Protein McyJ wurde der Gendatenbank entnommen [GeneBank-Acc. Nr.: Q9RNB8].

3.7.4 Analyse von *spiL*

Das stromabwärts codierte SpiJ (s. Abb. 12 und Tab. 16) besitzt Ähnlichkeit zu Cytochrom P-450 abhängigen Oxygenasen aus *M. xanthus* oder *Nostoc punctiforme* (s. Abb. 15). Es weist das konservierten Aminosäuresequenzmotiv auf, das für die Aktivität verantwortlich ist (PROSITE PDOC00081).

```

SpiL: 12  LPPGPRSPMALQTLQWLKNPVFLEACGARYGEMFTLKLPTQWP-VVVVQHPEAVKEVFA 70
LP GP++ +Q QWL NP+ ++EAC RYG++FTLKL + V + +P+A+++F
Cyt.: 6  LPNGPQTHPWIQMYQWLTPLEMEACTKRYGDIFTLKLGQNFQVFIQAIQIIFT 65

SpiL: 71  LDSNAGHAGEANNILKPFLGKYSLLVLDGEEHMRQRKMMMPAFHGERMEAYGHAMIDAHAH 130
D +GE+ I P LG+ SLL LDG+ H RQRK++ P FHGERM AYG + +
Cyt.: 66  TDPKQLDSGESAGIKAPLLGQSSLLALDGGKPHQQRKLLTPPFHGERMLAYGELIREITE 125

SpiL: 131 ASIDAWPVGSPFGVHAPMQAITLQVILRTVVGMTDGPLLAELALYPQVIDAA----SAP 186
W VG F V MQAI+ QVIL+ V G+ DGP +L L ++++
Cyt.: 126 QVSSQWQVGETFAVLPSMQAISFQVILKAVFGLEDGPRYKKNELLIKILNPKIPLLRV 185

SpiL: 187 AMHFELFRKDLGPWSPWGKFKRRSARGKEIMIHEIRRAREKGTAGRTDVLAMIIDAKDEN 246
+ F R+DLG WSPWGK+ R + +++ +I+ + + TD+L++++ A+DE
Cyt.: 186 LLIFPSMRQDLGAWSPWGKYLRLRQQIDQLIYAQIQERKAQPNLSGTDILSLMMAARDEA 245

SpiL: 247 GELLTEDEIHGELMTLLVAGHEXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXD--DPVK 304
GE +T+ E+ ELMTLLVAGHE + DP
Cyt.: 246 GEPMTDLELRDELMTLLVAGHETTATSLSWALYWIHHRPQVREKLLQELDNLGEKPDPA 305

SpiL: 305 IAKSELLDRVVKEALRLQPIG-PVVARVLKQPLTIQGRELPADVMVAPCVQLLHHRPSLY 363
I + L+ V E LRL P+ + R++K PL I ++ P + L HHR LY
Cyt.: 306 IFRLPYLNAVCSSETLRLYPVAMSALNRLVKSPLQIGEYNFEPGTILIPSIYLTTHHREDLY 365

SpiL: 364 PEPTRFDPDYATFTPKPWEFIPFGGGLRKCIGAAFSMYEMKMVLATAFSRLSMELA-TD 422
PE +F P+R+ P+E++PFGGG R+CIG AF+++EMK+VLAT SR MELA +
Cyt.: 366 PESKQFKPERFLERQFSPEYELPFGGGNRRRCIGMAFALFEMKLVLATVLSRWQMELADSK 425

SpiL: 423 DIKIIRRGVTLAPSGGLPLVIRKK 446
++ +R+G+ +P+GG+ +V++ K
Cyt.: 426 PVRPVRKGLLFSPAGGVQMVVKGK 449

```

Abb. 15: BLAST- Vergleich von SpiL mit einer Cytochrom P-450 Monooxygenase.

Konserviertes Aminosäure-Motive (s. Tab. 16) ist überstrichen. Cyt Cytochrom P450- Monooxygenase. Das Protein Cyt. aus *Nostoc punctiforme* wurde der Gendatenbank entnommen [GeneBank- Acc. Nr. AAAY02000088.1:]

3.7.5 Analyse von *spiZ*

Stromabwärts in umgekehrter Orientierung an die bisher beschriebenen offenen Leserahmen findet sich der offene Leserahmen *spiZ* (s. Abb 12 und Tab. 16). Das abgeleitete Protein zeigt Ähnlichkeit zu Sigma-Faktoren der ECF-Familie. Das Aminosäuresequenzmotiv, das diese Proteinfamilie definiert ist, wurde nach Lonetto et al. (1994) identifiziert.

Die Analyse des ORFs *spiZ* zeigt drei mögliche Startcodons vor denen sich jeweils eine Ribosomenbindestelle befindet (Daten nicht gezeigt). Mit diesen Ergebnissen lassen sich drei unterschiedliche Größen von 251, 226 oder 185 Aminosäuren für diesen ORF ableiten. SpiZ zeigt in der BLAST-Abfrage deutliche Ähnlichkeiten zu Regulatoren aus der Familie der ECF-Sigmafaktoren (Lonetto et al., 1994), wie z. B. SigX (*B. subtilis*,

Huang et al., 1997). Die größte Ähnlichkeit mit 50 % besitzt SpiZ zu CarQ (Hodgson, 1993; Hodgson et al., 1998), einem lichtabhängigen Regulator der Carotinoidbiosynthese in *M. xanthus* (s. 1.7). Ein Vergleich von SpiZ mit CarQ und SigX ist in Abb. 16 dargestellt. Bei der Analyse des Proteinvergleichs fällt auf, dass das abgeleitete Protein SpiZ am N-Terminus 66 Aminosäuren mehr besitzt und so größer wäre als das im Vergleich gezeigte CarQ. Allerdings weist SpiZ nahezu die gleiche Länge auf wie CarQ, wenn das dritte potentielle Startcodon (s. o.) den eigentlichen N-Terminus darstellt.

SpiZ	MNADHDSSEAKLSALERRTKSGRADRRGASWPRREDESGLSAEARATPAGEALPAGDGR	60
CarQ	-----	
SigX	-----	
SpiZ	EREKSAMDRYVSGQVTAFRELYEELAPRLFRYILRRTRDAALAEDLLQQTMLQIHATRHR	120
CarQ	-----MERFRDGAQDAFEDLFARHAPRVQGFLARMVRNGALAEDLLQATFLSVIRSRGR	54
SigX	-----MEETFQLLYDITYHQDLYQFLFYMKDKNQTEDLLQEVYIRVLNSYHT	47
	: * : : . : : ***** . : :	
SpiZ	FAAGSNVSPWAYSLARRVINHSRKAESLVDPS-----SFDDVASTA	163
CarQ	YEPGTRFIPWLMTIAANAARDALR-HQRHVDAYA-----SREDTATPA	96
SigX	FEGRSSEKTWLLSIARHVAIDWFRKQQTIRQRILGTFDWDTDQDVRDQQ	95
	: : . * : * . : : : : *	
SpiZ	QSTDESLDASRRSRALEYALTMLPETQRVIVTLIKDDSSIRGIAEVLGISVN	216
CarQ	SAAPDDSDPSLR-RHLLDALQQLHPDHREAVVLSKVEGWSFEEIGALRGISPG	148
SigX	LLPDELAVQHENVREISCALDQCTIDQRAVILRFIQGYSIQETAKALRFSES	148
	. : ** : * : * . * . *	
SpiZ	AAKLRRHRACLALR---AAISAEHGEV	241
CarQ	AARLRAHRGYEKLK---ELLG-ELELEV	172
SigX	KVKTTQHRGLKVLKHMELLREELMDDEVIMER	181
	. ** . * : * : .	
SpiZ	APMDDSLDA---	251
CarQ	AR-----	174
SigX	RTDKGVVKSTSGS	194

Abb. 16: Vergleich von SpiZ mit CarQ und SigX.

Die Sequenz CarQ aus *M. xanthus* und SigX aus *B. subtilis* wurden der EMBL-Datenbank entnommen. . ähnliche Aminosäuren; : zwei identische Aminosäuren; * alle Aminosäuren an dieser Position identisch. M zeigt die möglichen Translationsstartpunkte an.

Da *spiZ* im Anschluss zu dem möglichen Spirangienbiosynthesegencluster liegt, konnte vermutet werden, dass es sich um einen Regulator der Spirangienbiosynthese handelt, der aufgrund seiner umgekehrten Orientierung zu den restlichen Clustergenen eine unabhängige Promotorstruktur besitzt. Die Analyse des zum ersten Startcodon (Position bp 47060) stromaufwärts liegenden Sequenz zeigt das Vorhandensein von fünf

möglichen Promotorstrukturen die der σ^{70} Konsensussequenz und dem des Kanamycinpromotors, welcher auch von Sorangien erkannt wird, ähneln (s. Tab. 17). Eine Übereinstimmung wird hier mit der Basenabfolge CA in der -35-Region und TA in der -10-Region gefunden. Eine experimentelle Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde nicht vorgenommen.

Tab. 17: Mögliche Promotorstrukturen vor *spiZ* im Vergleich zu bekannten σ^{70} abhängigen Promotoren

Promotor/Gen	-35	Abstand [bp]	-10	Entfernung zum ATG-Startcodon [bp]
σ^{70} - Konsensus	TTGACA	17	TATAAT	6*
AphII	TTGCCA	17	TAAGGT	104
<i>spiZ</i>				
1	TGAGCA	17	TAACTG	52
2	GCGTCA	20	TACGTT	212
3	GAGACA	16	TAAGCG	241
4	GATTCA	16	TAGAAA	334
5	GCCTCA	17	TAAAAG	350

Die Sigma 70 Konsensussequenz wurde Dombroski (1997) entnommen.

Die Sequenz des beschriebenen DNA-Abschnitts der möglichen Spirangiensynthese und der abgeleiteten Proteine ist unter der Acc. Nummer [AJ505006] in der Gen-Datenbank veröffentlicht.

3.7.6 DNA-Sequenzwiederholungen im A7-Genclusterbereich

Bei den auf den Cosmiden A7 und A6 klonierten Teil des *spi*-Genclusters handelt es sich wahrscheinlich um 9 Module, die für den Einbau von Propionat und Acetateinheiten in das Spirangienmolekül verantwortlich sind (s. 3.7.2 und 4.).

Um die stromaufwärtsliegenden *spi*-Gene zu analysieren, wurden mit Hilfe des Programms GeneQuest aus dem DNA-Star Programmpaket (s. 2.20) diese DNA-Sequenz mit sich selbst verglichen und als Dot-blot dargestellt (s. Anhang). Zwei große Bereiche von fast 8,2 kb, die eine Identität von 91 % aufweisen (bezeichnet als 1a und 1b) konnten identifiziert werden. Die Lage dieser Sequenzwiederholungen relativ zum

spi-Gencluster der im Dot-blot detektierten Bereiche ist in Abb. 17 dargestellt. Position und Identität finden sich in Tab. 18.

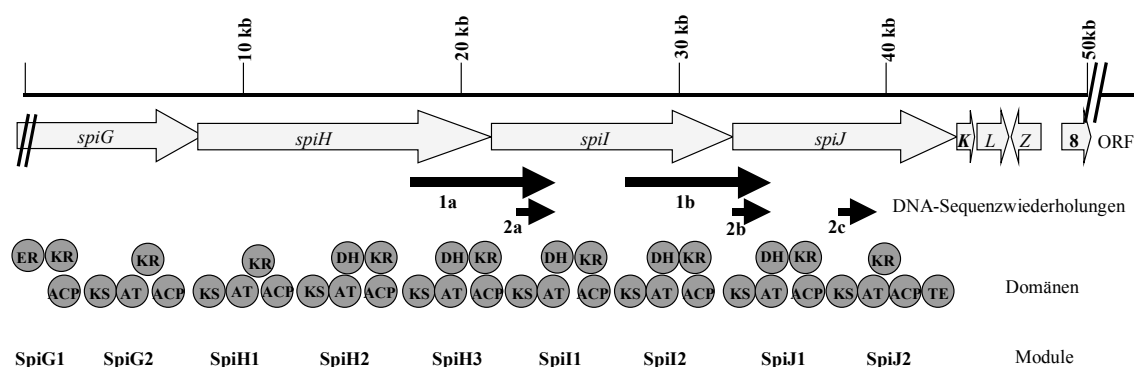


Abb. 17: Position von DNA-Sequenzwiederholungen im *spi*-Gencluster.

Bezeichnungen und Abkürzungen s. Tab. 15 und 19

Tab. 18: Sequenzwiederholungen in den Genen *spiI* und *spiJ*

Sequenzwiederholung	Position (Länge in bp)			Paarweise Identität
	a	b	c	
1	17205-25368 (8163)	27611-35890 (8280)		91%
2	23003-25370 (2368)	33525-35905 (2383)	39165-41271 (2107)	98%/97%*

* Der Wert 97% bezieht sich auf die Identität von 2a und 2b gegenüber 2c; 98% Identität liegt zwischen 2a und 2b vor.

Der Bereich 1a der DNA-Sequenzwiederholung umfasst das gesamte Modul SpiH3, sowie die Domänen KS und AT des Folgemoduls SpiI1 und korrespondierend zu dem Modul SpiI2 und den KS- und AT-Domänen von SpiJ1 (Bereich 1b). Innerhalb dieser 8,2 kb findet sich ein weiterer Bereich, definiert als 2a und 2b von jeweils etwa 2,4 kb, der ein drittes mal vorhanden ist (2c). Diese Bereiche codieren die KS- und AT-Domänen der Module SpiI1, SpiJ1 und SpiJ2. Die paarweise Identität von 2a und 2b zueinander beträgt 98%. Gegenüber 2c beträgt deren Identität 97%. Die Sequenzvergleiche sind im Anhang dargestellt. Zwischen 2a, 2b und 2c lassen sich weitere Unterschiede feststellen. Die Sequenzwiederholungen 2a und 2b sind gegenüber 2c um 270 bp am 5'-Terminus länger. 2b und 2c hingegen haben am 3'-Ende

16 gemeinsame Nukleotide, die dem Bereich 2a fehlen. Dagegen besitzen die Bereiche 2a und 2b identische Sequenzlücken (gaps) die im Bereich 2 c fehlen. Der Bereich 2a ist damit am ähnlichsten zu 2b, wobei 2b jedoch einen identischen DNA-Bereich zu 2c aufweist, der in 2a nicht vorkommt.

3.8 Weitere Genloci codieren für PKS und NRPS

Aus den 106 rekombinanten Cosmiden aus der Genombibliothek von *S. cellulorum* So ce90 konnten weitere Cosmide gefunden werden, die zueinander Anschlußcosmide darstellen (s. Tab. 10). Es handelt sich dabei um das Cosmid 40, welches mit den Cosmiden 17 und 55 eine Gruppe bildet (A9) und dem Cosmid 81, welches mit Nr. 33 identisch ist und zu Nr. 82/83 und 39 aufgrund der Restriktionsanalyse eine Überlappung aufweist (A10). Ob diese beiden Gruppen weitere unabhängige Genclusterbereiche des Typs PKS und/oder NRPS darstellen oder Übergänge zu den bisher behandelten Bereichen darstellen wurde nicht gezeigt.

3.9 Entwicklung eines Geninaktivierungssystems mit neuen Selektionsmarkern

Um die Funktionalität der beschriebenen Genloci zu bestimmen, sollten diese inaktiviert werden. Mit den resultierenden Phänotypen können Rückschlüsse auf die Beteiligung der entsprechenden Gene an der möglichen Biosynthese von Sekundärstoffen gezogen werden. Die genetische Manipulation von Sorangien beschränkt sich auf die bisher beschriebene Methode der Konjugation mit Derivaten des Plasmids RP4 (Jaoua et al., 1992). Dabei wird das Antibiotikum Phleomycin als Selektionsmarker verwendet. Eine Gegenselektion des Donor-*E. coli* Stammes nach der Konjugation erfolgt mit Streptomycin, wobei für diesen Ansatz streptomycinresistente Spontanmutanten des jeweiligen Stammes benötigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach neuen Selektionsmarkern gesucht, die eine einfache Handhabung und mögliche Optimierung oder Erweiterung des bestehenden Systems beinhalten.

3.9.1 Untersuchungen zur Antibiotika-Resistenz in *S. cellulorum* So ce90 und *St. aurantiaca* DW 4/3-1

Für die Überprüfung einer natürlichen Resistenz von *S. cellulorum* So ce90 wurden Erythromycin, Hygromycin B und Tobramycin ausgewählt. Kanamycin, welches

routinemäßig bei anderen Bakterienstämmen eingesetzt wird, kann aufgrund einer intrinsischen Resistenz nicht als Selektionsmarker für *S. cellulorum* So ce90 verwendet werden (Schupp et al., 1995).

Parallel wurden Resistenztests der o. g. Antibiotika mit *St. aurantiaca* DW 4/3-1 durchgeführt. In diesem Stamm sind genetische Methoden unter Benutzung der Elektroporation etabliert, weshalb er für eine Funktionalitätsprüfung der konstruierten Inaktivierungsplasmide eingesetzt werden sollte. Gegen Tobramycin zeigte *S. cellulorum* So ce90 eine Resistenz bis zu einer getesteten Konzentration von 120 µg/ml. Damit stellt Tobramycin eine neue Möglichkeit der *E. coli* Donor-Gegenselektion dar, da keiner der verwendeten *E. coli*-Stämme HB101, RK600, ET12567 pUB307 (s. 2.3 Tab. 3 und Tab. 4) eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum zeigte.

Wie aus Tab. 19 ersichtlich ist, waren die getesteten Myxobakterienstämme gegen Erythromycin und Hygromycin B sensitiv. Die Selektion von Sorangien auf Festmedien stellte sich dabei als weniger effektiv heraus als die Selektion in Flüssigmedien.

Als Selektionsmarker stehen nach diesen Ergebnissen die beiden Antibiotika Erythromycin und Hygromycin B zur Verfügung. Für die Entwicklung einer Resistenzkassette können die Resistenzgene ErmE und Hyg^R Verwendung finden. Da sowohl die Resistenz ErmE als auch Hyg^R aus den Gram-Positiven Actinomyceten stammt und deshalb eine Transkription in Myxobakterien wenig wahrscheinlich ist, wurde versucht, die Resistenzgene unter Kontrolle eines Promotors zu stellen, der von der myxobakteriellen RNA- Polymerase erkannt wird. Unter der Kontrolle des Kanamycinpromotors *aphIIp* aus Tn5, der schon in *St. aurantiaca* erfolgreich verwendet wurde, sollten diese Gene in *S. cellulorum* So ce90 und *St. aurantiaca* DW4-3/1 Resistenz vermitteln.

Tab. 19: Analyse des Wachstums von *S. cellulosum* So ce90 und *St. aurantiaca* DW4/3-1 in Anwesenheit von Erythromycin und Hygromycin B

Erythromycin [µg/ml]	Wachstum <i>St.</i> <i>aurantaca</i> DW4/3-1 Flüssigmedium (Trypton-Medium)	Wachstum <i>St.</i> <i>aurantaca</i> DW4/3-1 Festmedium (Trypton-Agar)	Wachstum <i>S.</i> <i>cellulosum</i> So ce90 Flüssigmedium (P-Medium)	Wachstum <i>S.</i> <i>cellulosum</i> So ce90 Festmedium (P-Agar)
0	+	+	+	+
20	-	-	-	(+)
50	n.g.	-	n.g.	-
75	-	n.g.	-	n.g.
100	n.g.	-	n.g.	-
150	-	-	-	-
Hygromycin B				
0	+	+	+	+
20	-	+	-	(+)
50	n.g.	-	n.g.	(+)
7	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	n.g.	-	n.g.	n.g.
0	-	-	-	-
150	-	n.g.	-	-
200	n.g.	n.g.	n.g.	-
250	n.g.	n.g.	n.g.	-

+ Wachstum wie Kontrolle, (+) reduziertes Wachstum gegenüber der Kontrolle; - kein Wachstum, n.g. nicht getestet

Gegen Erythromycin konnten keine resistenzvermittelnden Fragmente kloniert werden. Getestete Konstrukte erbrachten in *E. coli* keine Resistenz und konnten auch nicht in *S. aurantiaca* DW4/3-1 integriert werden (Daten nicht gezeigt).

3.9.2 Resistenzvermittlung von pJKB10 in *E. coli* und *St. aurantiaca* DW 4/SB1

Für die hygromycinvermittelnde Resistenz wurde die Hygromycinphosphotransferase ohne eigenen Promotor aus dem Plasmid Ωhyg (s. 2.3; Tab. 4.) über PCR amplifiziert und in den Vektor pTOPOpro (s. 2.3; Tab. 4) unter die Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes gestellt (s. 2.10.1). Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe

der *Pfu*-DNA-Polymerase und den Oligonukleotiden HygU und HygD durchgeführt. Dem Ansatz wurden 10 % DMSO zugesetzt und eine Hybridisierungstemperatur von 56 °C eingestellt. Für die Amplifikation des 1,7 kb großen DNA-Fragmentes wurde eine Verlängerungszeit von 2 min. verwendet (vgl. Tab. 8). Das resultierende Plasmid ist pJKB10. Um die Resistenzvermittlung zu untersuchen, wurde das Plasmid pJKB10 (mit dem Hygromycinresistenzgen; s. 2.10.1) zunächst in die *E. coli*-Stämme DH10B und ET12567 eingeführt und diese danach auf das Wachstum in Anwesenheit von verschiedenen Hygromycin B Konzentrationen getestet (Daten nicht gezeigt). Die Stämme, die das Plasmid pJKB10 enthielten, zeigten eine Resistenz bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml Hygromycin B gegenüber den Kontrollen, die nicht das resistenzvermittelnde Plasmid pJKB10 trugen.

Die Resistenzvermittlung des *hygR*-Gens in Myxobakterien wurde zunächst bei *St. aurantiaca* DW4SB1 überprüft. Im Unterschied zu *St. aurantiaca* DW 4-3/1 wurde in das Genom dieses Stammes das Plasmid pGEM7 zf(-) einschliesslich eines unter Kontrolle des *aphIIp* Promotors stehendes Bleomycinresistenzgens integriert. Damit ist der Stamm gegenüber mittleren Konzentrationen (5 µg/ml-100 µg/ml) von Bleomycin, Phleomycin und Zeozin resistent. Eine Resistenz weist *St. aurantiaca* DW4SB1 genauso wie *St. aurantiaca* DW4/3-1 auch gegenüber Streptomycin (120 µg/ml) auf (Qualls et al., 1978).

Mit dem *bla*-Gen und dem *aphIIp*-Promotor befinden sich somit 230 bp bzw. 400 bp identische DNA-Sequenz im Chromosom von *St. aurantiaca* DW4SB1 und auf dem Plasmid pJKB10. Diese können somit als Substrat für eine homologe Rekombination. Die Transformation erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben. Da die Resistenzvermittlung auf Hygromycin B durch die Integration von pJKB10 in das Genom von *St. aurantiaca* nicht gesichert war, erfolgte die Selektion der Transformanten zunächst mit Kanamycin. Die Resistenzvermittlung gegenüber Kanamycin mit der Integration von pTOPO-Derivaten konnte bereits gezeigt werden (Silakowski et al., 1999). Erhaltene Kolonien wurden anschließend von Selektions-Agarplatten (s. 2.2.1) in flüssiges Tryptonmedium überführt und mit unterschiedlichen Hygromycin B Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten getestet. Es zeigte sich eine Resistenzvermittlung bis zu getesteten 150 µg/ml. Die Integration von pJKB10 wurde mit Hilfe der PCR und einer Southern Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Nach dem Beweis der erfolgten Resistenzvermittlung in *St. aurantiaca* DW4SB1 sollte untersucht werden, welche Konzentration an Hygromycin B sich zur direkten Selektion der Transformanten auf Festmedien eignet. Nach Transformation der *Stigmatella*-Zellen mit pJKB10 wurden die Zellen auf Trypton-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hygromycin ausgebracht. Die meisten Klone konnten bei einer Konzentration zwischen 50-60 µg/ml erhalten werden. Unter diesen Klonen wurden bei dieser Konzentration keine spontanresistenten Kolonien erhalten. Die Konzentration zur Selektion von *S. cellulosum* So ce90 Transformanten wurde daraufhin auf 60 µg/ml Hygromycin B festgelegt.

3.9.3 Triparentale Konjugation von *S. cellulosum* So ce90

Die Inaktivierungsplasmide pJKB16 und pJKB19 (s. 2.20.2 und 2.10.3) wurden auf der Basis des mobilisierbaren Vektors pSUP1021 (Simon et al., 1986), einem Derivat des Vektors RP4 konstruiert. pSUPHyg, pJKB29 und pJKB30 (s. 2.10.4) basieren auf dem mobilisierbaren Vektor pSUP102 (Simon et al., 1983). Beide besitzen den zum Transfer notwendigen *oriT* und die *mob*-Region. Die Konstruktion der Plasmide ist unter 2.10 beschrieben. Die zum Transfer notwendigen *tra*-Gene liefern die Helferplasmide RK600 und pUB307 in den Stämmen *E. coli* HB101, bzw. *E. coli* Et12567. *E. coli* Et12567 pUB307 trägt das Inaktivierungsplasmid. Mit den ersten Experimenten wurde versucht, eine biparentale Konjugation zwischen den Partnern *E. coli* ET12567 pUB307 (mit Inaktivierungsplasmid) durchzuführen. Mit diesen Ansätzen gelang es jedoch nicht, Transkonjuganten von *S. cellulosum* So ce90 zu erhalten. Erst unter Verwendung des Helferstammes *E. coli* HB101 RK600 konnte die erfolgte Konjugation gezeigt werden (s. 4.). Das Protokoll der triparentalen Konjugation in Anlehnung an bereits publizierte Protokolle (Schupp et al., 1996; Pradella et al., 2002) ist unter Abschnitt 2.14.3 beschrieben.

3.10 Funktionelle Analyse und Charakterisierung des A7-Genlocus

3.10.1 *spiH* ist an der Spirangienbiosynthese beteiligt

Durch die Integration des Plasmids pJKB16 im *spiH*-Gen sollte ein möglicher Einfluß auf die Produktion von Spirangien untersucht und somit die postulierte Funktion der abgeleiteten Proteine aus den *spi*-Genen belegt werden. Das mobilisierbare Plasmid

pJKB16 enthält neben der Hygromycinresistenz, die zur Selektion von Transkonjuganten benutzt wird, ein 1,5 kb großes DNA-Fragment aus dem Modul SpiH1 (s. 2.10). Nach der Konjugation (s. 2.14.3 und 3.9.3) wurden 10 hygromycinresistente Transkonjuganten erhalten.

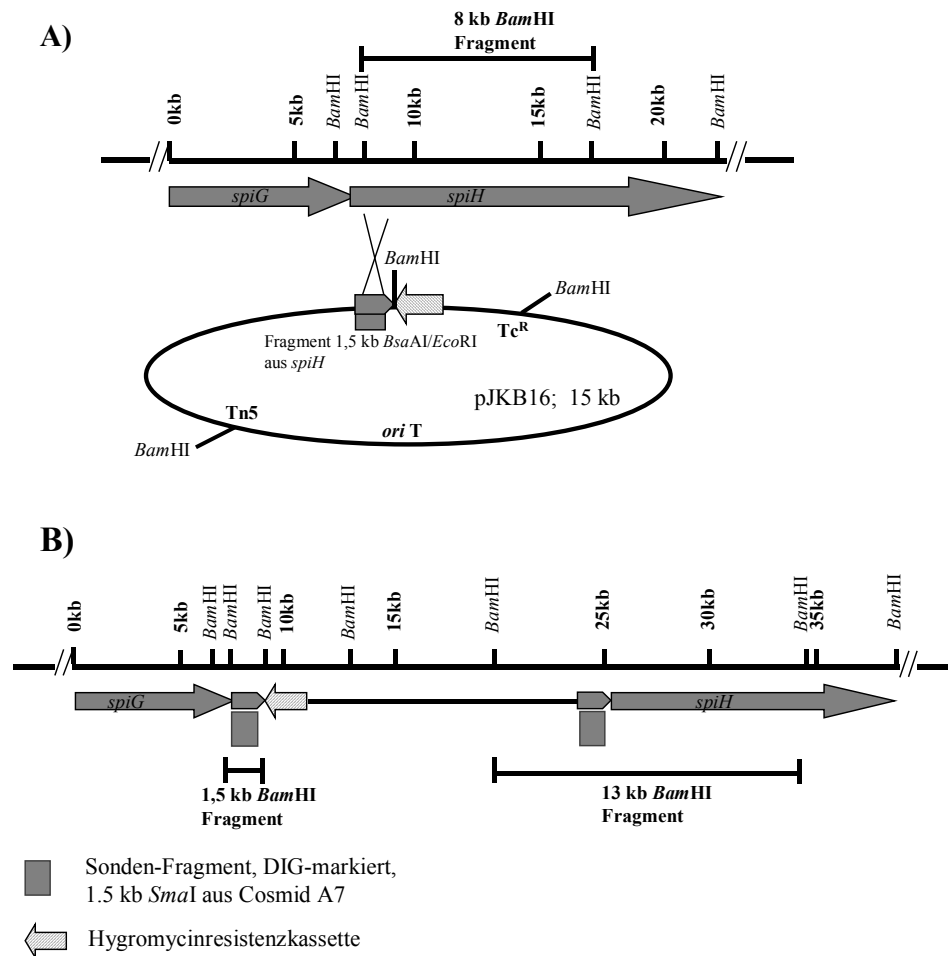


Abb. 18: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB16 über homologe Rekombination im Genort *spiH*.

Gezeigt sind ausgewählte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und erwartete Größen der nach Hydrolyse entstehenden Fragmente vor (A) und nach Integration des Plasmides pJKB16 (B) bei Hybridisierung der angegebenen markierten DNA- Sonden. *Tn5* Integriertes Transposon; *oriT* origin of transfer; *Tc*^R Tetracyclinresistenz

Mittels Southern Blot-Analyse wurde die korrekte Integration des Vektors pJKB16 in das Genom von *S. celluloseum* So ce90 überprüft. Zur Hybridisierung wurde das für die homologe Rekombination verwendete 1,5 kb DNA-Fragment benutzt. Die Verhältnisse, die nach der Integration des Vektors pJKB16 entstehen sollten, sind in Abb. 18 und das Ergebnis der Hybridisierung in Abb. 19 dargestellt. Im Wildtyp ist dabei eine hybridisierende Bande der Größe 9 kb, bei den untersuchten Transkonjuganten hybridisierende Fragmente mit den Größen von 1,5 kb und 13 kb zu erkennen. Diese Größen entsprechen den Erwartungen.

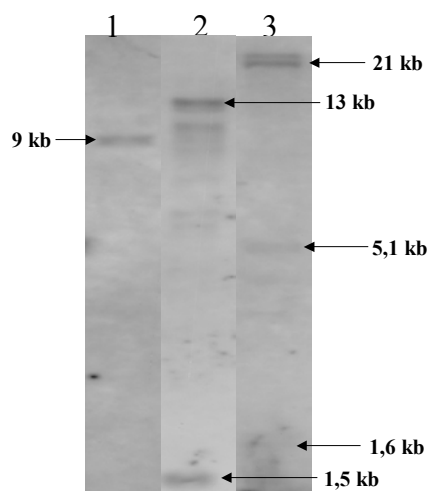


Abb. 19: Hybridisierung gegen genomische DNA von *S. celluloseum* So ce90 und der Mutante *S. celluloseum* So ce90JKB16 zu Nachweis der Integration von pJKB16.

Gezeigt ist das Autoradiogramm. Als Sonde wurde das 1,5 kb große Inaktivierungsfragment aus dem Bereich *spiH* verwendet. 1: genomische DNA *S. celluloseum* So ce90, *Bam*HI hydrolysiert 2: genomische DNA *S. celluloseum* So ce90 JKB16, *Bam*HI hydrolysiert 3: DIG-Größenstandard III (Roche Molecular Biochemicals).

Fünf Transkonjuganten mit der Bezeichnung *S. celluloseum* So ce90 JKB 1, 2, 16, 17 und 18 wurden repräsentativ auf ihre Produktion von Sekundärmetaboliten untersucht.

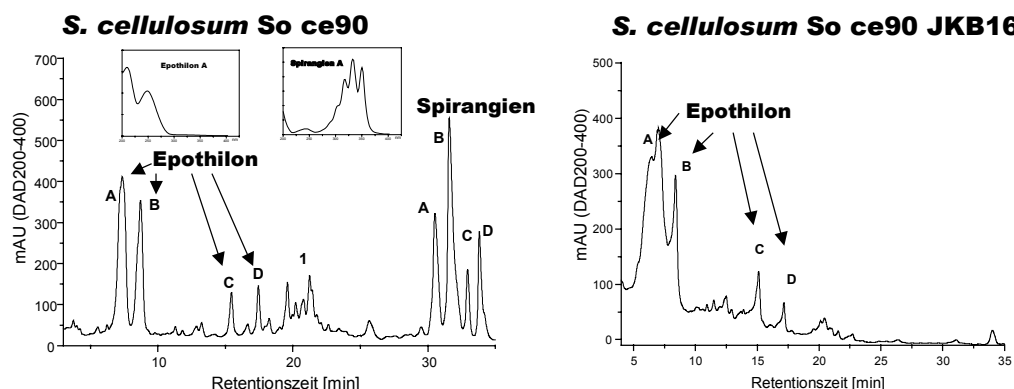


Abb. 20: HPLC- Chromatogramme der Kulturextrakte von *S. celluloseum* So ce90 und der Mutante JKB16.

Gezeigt sind die Retentionszeiten der Epothilone A-D und die Spirangiene A-D sowie das Absorptionsspektrum von Epothilon A und Spirangien A. 1 zeigt Abbauprodukte mit Spirangien-ähnlichem Absorptionsspektrum.. Für die HPLC- Läufe wurde der Gradient G2 (s. 2. 17) verwendet.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, bei der das HPLC- Chromatogramm des Wildtyps *S. celluloseum* So ce90 repräsentativ mit dem der Mutante *S. celluloseum* So ce90 JKB16 verglichen wird, produziert der Stamm *S. celluloseum* So ce90 JKB16 keine Spirangiene. Das Gen *spiH* ist somit an der Biosynthese von Spirangien beteiligt.

3.10.2 Versuche der Inaktivierung von *spiK*

Mit dem Plasmid pJKB28, das ein 480 bp Fragment aus dem Bereich *spiK* enthält (s. 2.3 Tab. 5 und 2.10.4), wurde versucht, die postulierte Funktion von SpiK zu bestätigen. SpiK, mit Homologie zu Methyltransferasen (s. 3.7.3), könnte dabei für einen oder beide Methylierungsschritte am Molekül des Spirangiens verantwortlich sein (s. 1.8). Es konnten aber in mehreren Konjugationen keine hygromycinresistenten Klone erhalten werden.

3.10.3 SpiL ist eine Monooxygenase

Die Aminosäuresequenz von SpiL zeigt Ähnlichkeit zu Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (s. 3.7.4). Dabei könnte SpiL in der Biosynthese des Spirangiens für die Einführung der Hydroxylgruppe an Position 20 des Spirangienmoleküls verantwortlich sein (s. 1.8, Abb. 4). Mit dem Plasmid pJKB29, das ein 850 bp großes DNA-Fragment des Gens *spiL* enthält (s. 2.3 Tab. 5 und 2.10.4), wurde eine

Konjugation mit dem Ziel einer homologen Rekombination in das Chromosom von *S. cellulorum* So ce90 durchgeführt, die die vermutete Funktion als Monooxygenase bestätigen sollte. Die erwarteten Verhältnisse durch die Integration von pJKB 29 sind in Abb. 21 dargestellt.

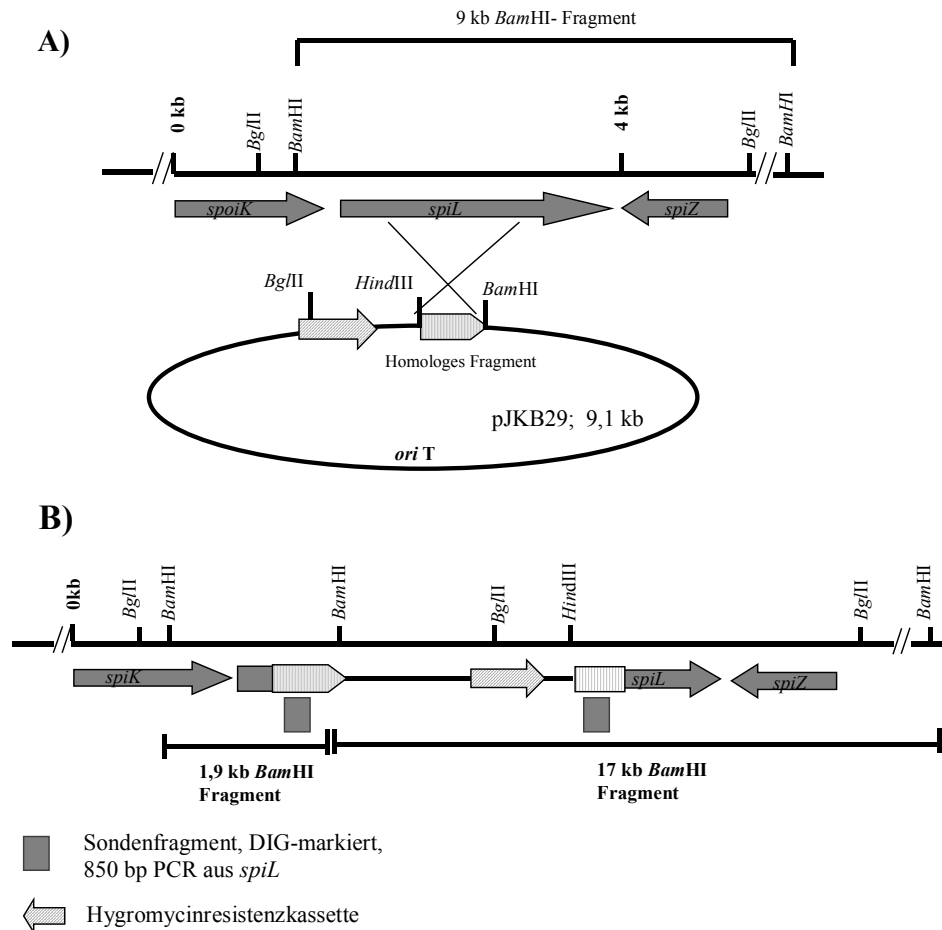


Abb. 21: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB29 durch homologe Rekombination im Genort *spiL*.

Gezeigt sind ausgewählte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und erwartete Größen der nach Hydrolyse der DNA entstehenden Fragmente vor (A) und nach Integration des Plasmides pJKB29 (B) bei Hybridisierung der angegebenen markierten DNA- Sonde.

Es wurden 3 Transkonjuganten (JKB19 I-III) repräsentativ durch Southern Blot-Analyse und PCR auf die korrekte Integration des Plasmides pJKB29 hin untersucht. Das Ergebnis der Hybridisierung mit genomischer DNA der Mutante JKB19I ist in Abb. 22 zu sehen. Wie erwartet lässt sich nach *Bam*HI- Hydrolyse das hybridisierende

Fragment von 9 kb im Wildtyp und in der Mutante die Fragmente der Größe 1,9 kb und 17 kb erkennen.

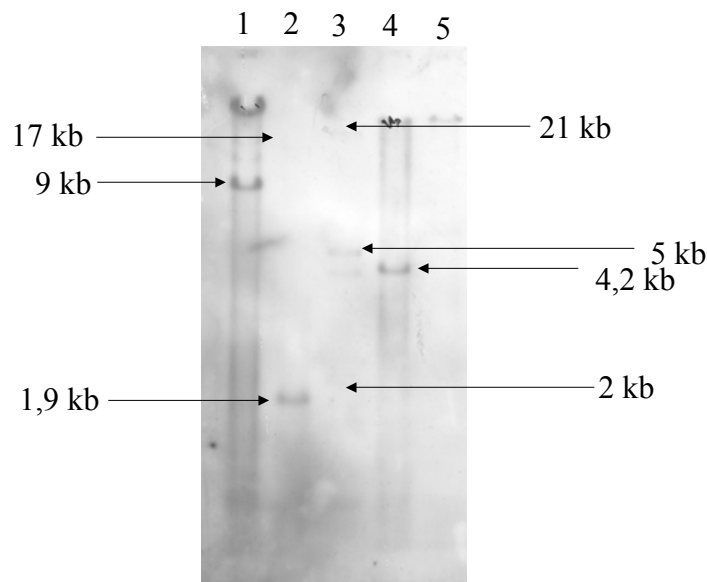


Abb. 22: Hybridisierung genomischer DNA von *S. celluloseum* So ce90 und der Mutante *S. celluloseum* So ce90 JKB19I..

Gezeigt ist das Autoradiogramm. Als Sonde wurde das 0,85 kb große Inaktivierungsfragment aus dem Bereich *spiL* verwendet. 1: genomische DNA *S. celluloseum* So ce90, *Bam*HI hydrolysiert 2: genomische DNA *S. celluloseum* So ce90 JKB29, *Bam*HI hydrolysiert 3: DIG- Größenstandard III (Roche Molecular Biochemicals) 4: genomische DNA *S. celluloseum* So ce90, *Bgl*II hydrolysiert 5: genomische DNA *S. celluloseum* So ce90 JKB29, *Bgl*II hydrolysiert. Alle DNA- Hydrolysen sind unvollständig und geben Signale einer Größe über 21 kb.

Anschliessend wurden die Klone auf ihre Fähigkeit Spirangiene zu produzieren untersucht. In Abb. 23 ist das erhaltene HPLC-Chromatogramm der Mutante *S. celluloseum* So ce90JKB19I im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

Die Signale der Spirangiene A-D mit den Retentionszeiten zwischen 30 min. und 34 min. sind nur beim Wildtyp, nicht aber bei der überprüften Mutante JKB19 I zu erkennen. Dafür werden vier Signale mit Retentionszeiten beobachtet, die bei 26-29 min. liegen und deren im Dioden-Array gemessenen Absorptionsspektren den Spirangienen gleichen. In einer durchgeführten HPLC-MS der Komponenten mit der

Retentionszeit von ca. 26 min. (1 Signal) wurden die relativen Massen von 706 und 838 gefunden.

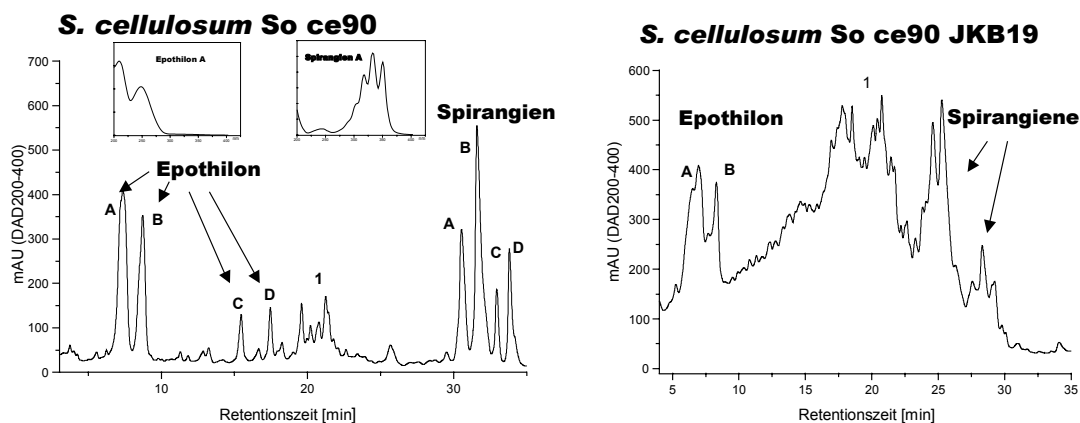
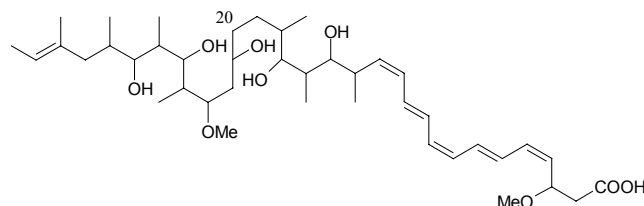


Abb. 23: HPLC-Chromatogramme der Kulturextrakte von *S. celluloseum* So ce90 und der Mutante JKB19I.

Gezeigt sind die Retentionszeiten der Epothilone A-D und die Spirangiene A-D sowie das Absorptionsspektrum von Epothilon A und Spirangien A. 1 zeigt Abbauprodukte mit Spirangien-ähnlichem Absorptionsspektrum. Für die HPLC-Läufe wurde der Gradient G2 (s. 2. 17) verwendet

Um die Strukturen der in der Massenspektrometrie bestimmten Komponenten aufzuklären, wurde eine 70 l Fermentation der Mutante JKB19I durchgeführt. Es konnten die Komponenten A und B isoliert und in ihrer Struktur bestimmt werden (Höfle und Steinmetz, pers. Mitteilung). Wie in Abb. 24 dargestellt handelt es sich bei der Struktur A um ein offenkettiges Spirangien ohne Ketalstruktur, wobei an Position 20 im Molekül keine Hydroxylgruppe nachzuweisen ist. Damit ist die Funktion von SpiL, die an Position 20 im Spirangienmolekül für das Einfügen einer Hydroxylgruppe verantwortlich ist, bestätigt. Die Struktur des Moleküls B zeigt das Vorhandensein einer Pentose (Furanose) an Position 25 des Spirangiengerüsts. Eine Pentose ist bisher nur bei Icumazol B aus dem Stamm *S. celluloseum* So ce12 beschrieben. Glykosylierte Spirangiene waren bisher noch nicht aus *S. celluloseum* So ce90 bekannt.

Komponente A



Komponente B

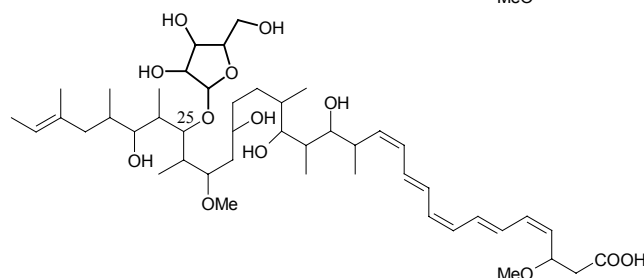


Abb. 24: Strukturen isolierter Komponenten der Mutante *S. cellulosum* So ce90 JKB19.

Komponente A: offenkettiges Spirangien (Spirangien X), Position 20 weist das Fehlen der Hydroxylgruppe auf. Komponente B: offenkettiges, glykosyliertes Spirangien, Position 25 zeigt gebundene Pentose an. Zum Vergleich der bisher isolierten Spirangiene s. Abb. 4.

3.10.4 SpiZ ist ein Regulator der Spirangienbiosynthese

Das Gen *spiZ*, stromabwärts in umgekehrter Orientierung zu *spiL* gelegen, zeigt in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu ECF-Sigmafaktoren (s. 3.6.2) und ist ein möglicher Regulator der Spirangienbiosynthese. Mit der Integration des Plasmides pJKB30 (s. 2.3 Tab. 5 und 2.10.4) soll die Funktion dieses Proteins untersucht werden. Die erwarteten Verhältnisse der Integration von pJKB30 sind in Abb. 25 dargestellt.

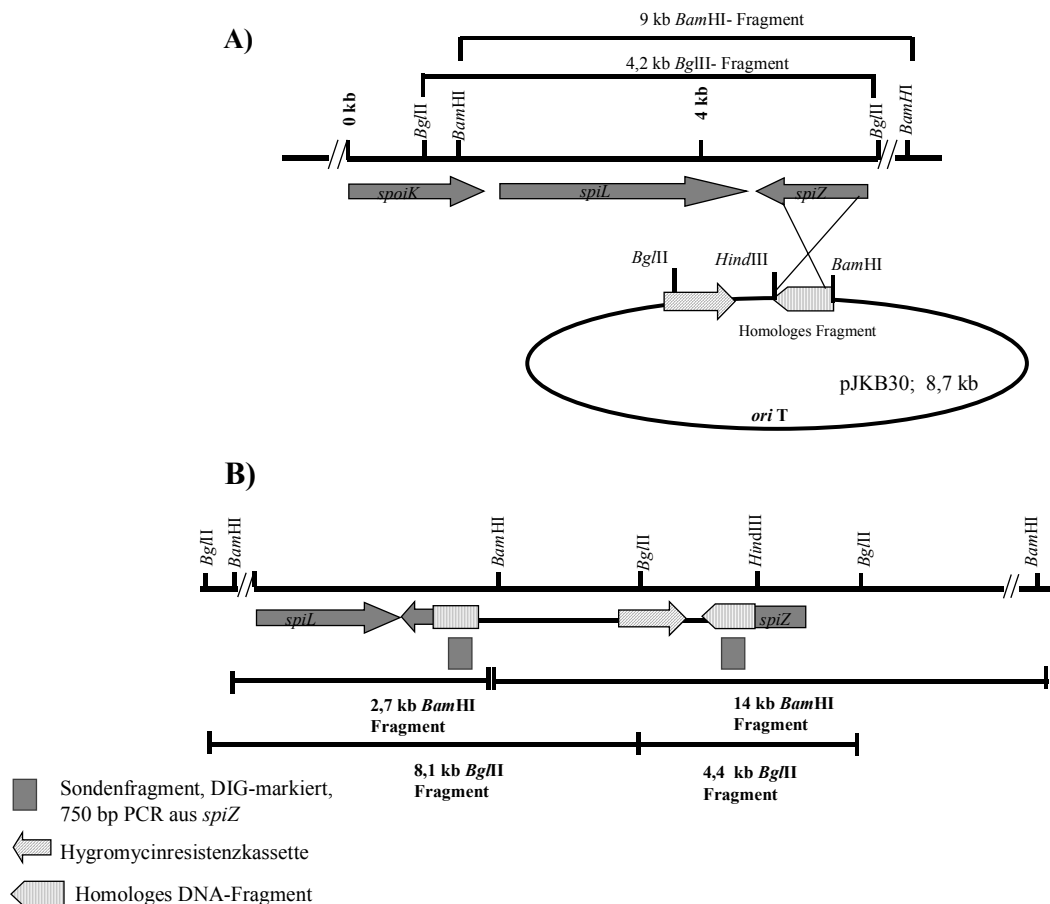


Abb. 25: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB30 durch homologe Rekombination im Genort *spiZ*.

Gezeigt sind ausgewählte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und erwartete Größen der nach DNA Hydrolyse entstehenden Fragmente vor (A) und nach Integration des Plasmides pJKB30 (B) bei Hybridisierung mit den angegebenen markierten DNA-Sonden.

Die Integration in das Genom von *S. cellulorum* So ce90 JKB15 wurde mittels Southern Blot-Analyse exemplarisch an 3 Mutanten (I-III) durchgeführt. Als Sonde für die Hybridisierung wurde das DIG-markierte Inaktivierungsfragment von 530 bp aus dem offenen Leserahmen *spiZ* verwendet. Repräsentativ ist in Abb. 26 das Ergebnis der Hybridisierung des Wildtyps und der Mutante *S. cellulorum* So ce90 JKB15I gezeigt.

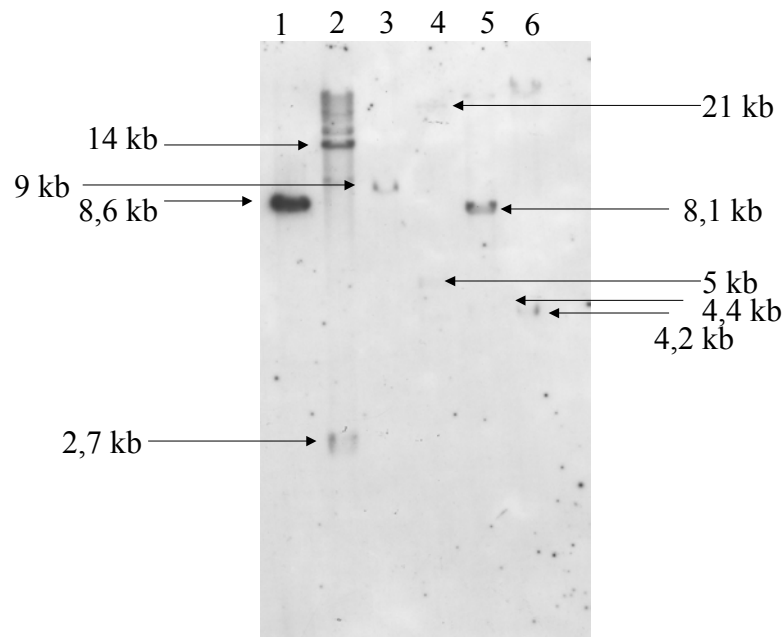


Abb. 26: Hybridisierung genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 und der Mutante *S. cellulorum* So ce90 JKB15I..

Gezeigt ist das Autoradiogramm. Als Sonde wurde das 0,53 kb große Inaktivierungsfragment aus dem Bereich *spiZ* verwendet. 1: pJKB30, BamHI hydrolysiert 2: genomische DNA *S. cellulorum* So ce90JKB30, BamHI hydrolysiert 3: genomische DNA *S. cellulorum* So ce90, BamHI hydrolysiert 4: DIG-Größenstandard III (Roche Molecular Biochemicals) 5: genomische DNA *S. cellulorum* So ce90JKB30, BglII hydrolysiert 6: genomische DNA *S. cellulorum* So ce90, BglII hydrolysiert

Drei Mutanten (JKB15I-III), welche die korrekte Integration des Vektors pJKB30 zeigten, wurden auf die Produktion von Sekundärmetaboliten über HPLC-Analyse analysiert. Das Ergebnis einer repräsentativen Mutante ist in Abb. 27 gezeigt.

S. cellulorum So ce90JKB15I produziert nach dieser Analyse keine Spirangiene, wohl aber Epothilon. Ebenfalls können keine Spirangienabbauprodukte detektiert werden. *spiZ* hat demnach einen Einfluss auf die Spirangienproduktion.

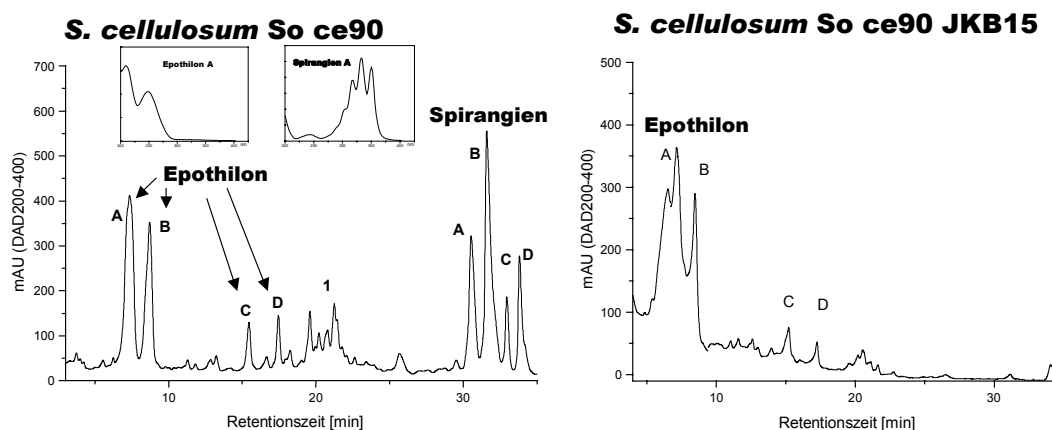


Abb. 27: HPLC-Chromatogramme der Kulturextrakte von *S. celluloseum* So ce90 und der Mutante JKB19I.

Gezeigt sind die Retentionszeiten der Epothilone A-D und die Spirangiene A-D sowie das Absorptionsspektrum von Epothilon A und Spirangien A. 1 zeigt Abbauprodukte mit Spirangien-ähnlichem Absorptionsspektrum Für die HPLC- Läufe wurde der Gradient G2 (s. 2. 17) verwendet.

3.10.5 Funktionelle Analyse und Charakterisierung von EpoF

DNA-Fragmente der Cosmidgenbibliothek von *S. celluloseum* So ce90, die die Epothilonbiosynthesegene enthalten, wurden in dieser Arbeit identifiziert und beschrieben (s. 3. 6). Die Funktion dieser DNA-Region sollte exemplarisch für das Gen *epoF* untersucht werden. Das Protein EpoF ist eine Cytochrom P-450 abhängige Oxygenase, welche die Epothilone C und D in die Epothilone A und B konvertiert (Julien et al., 2000; Julien und Sha, 2002).

Mit der Integration des Plasmides pJKB19 (s. 2.4, Tab. 5 und 2.10.3) in das Genom von *S. celluloseum* So ce90B2 (Gerth et al. 1996), einem Epothilonüberproduzenten, sollte die Funktion *in vivo* gezeigt werden. Von 4 hygromycinresistenten Klonen zeigte die DNA der Transkonjuganten *S. celluloseum* So ce90 JKB12 und *S. celluloseum* So ce90JKB14 über PCR- Analyse mit den Oligonukleotiden JKB32 und 33 das Vorhandensein der Hygromycinresistenzkassette (Daten nicht gezeigt). Die anschliessend erfolgte HPLC-Analyse der Kulturextrakte zeigte, daß die Transkonjuganten statt der Hauptprodukte Epothilon A und B Epothilon C und D bilden (s. Abb. 28).

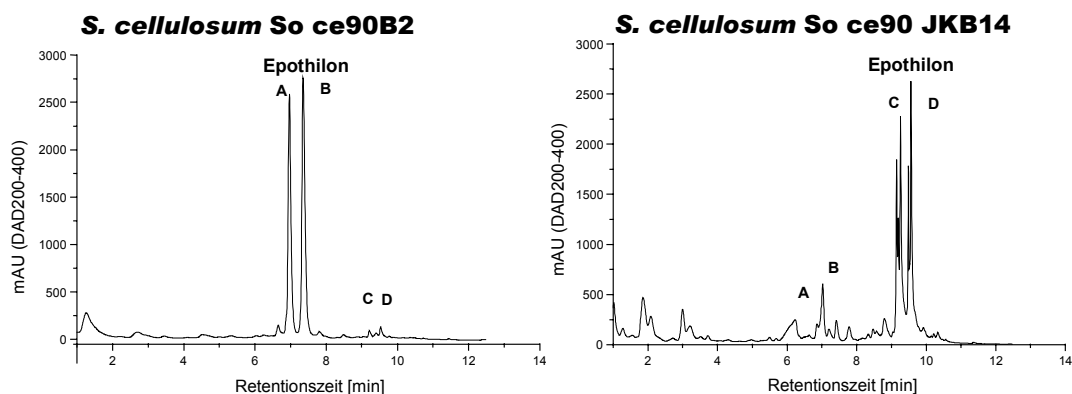


Abb. 28: HPLC-Chromatogramme der Kulturextrakte von *S. celluloseum* So ce90B2 und der Mutante JKB14.

Gezeigt sind die Retentionszeiten der Epothilone A-D. Für die HPLC-Läufe wurde der Gradient G1 s. 2. 17) verwendet.

Überraschend war jedoch, dass trotz der Inaktivierung des Gens *epoF* noch die Epoxidvarianten Epothilon A und B auftraten (Abb. 28, Retentionszeiten ca. 6,2 und 7 min.). Der Verdacht, dass alle *epoF*-Transkonjuganten keine Klone darstellen, sondern aus Wildtypzellen und *epoF*-Transkonjuganten zusammengesetzt waren, konnte nicht bestätigt werden. Nach einer Vereinzelung der *epoF*-Transkonjugantenzellen wurde bei allen Klonen derselbe Phänotyp im Bezug auf das Produktionsverhältnis von Epothilon A/B und Epothilon C/D festgestellt. Auch eine Überprüfung von präparierter Gesamt-DNA der *epoF*-Transkonjuganten ergab keine Hinweise auf eine Koexistenz von Wildtyp- und Transkonjugantenzellen. Die durch die Integration von pJKB19 angenommenen Verhältnisse, die die Grundlage zum folgend beschriebenen PCR-Experiment führten, sind mit der Lage der verwendeten Oligonukleotide in Abb. 29 dargestellt.

In der durchgeführten PCR-Reaktion sollte dabei nur im Wildtyp mit intaktem *epoF*-Gen ein Amplifikat von 1,2 kb mit den Oligonukleotiden EpoF f und EpoF r (s. 2.4, Tab. 6) erhalten werden. Mit der DNA der Transkonjuganten sollte mit unterbrochenem Leserahmen in *epoF* dabei kein Amplifikat dieser Größe entstehen (s. Abb. 30). Damit sollte ein Analysesystem genutzt werden, um auch kleine Mengen an Wildtyp-DNA nachzuweisen.

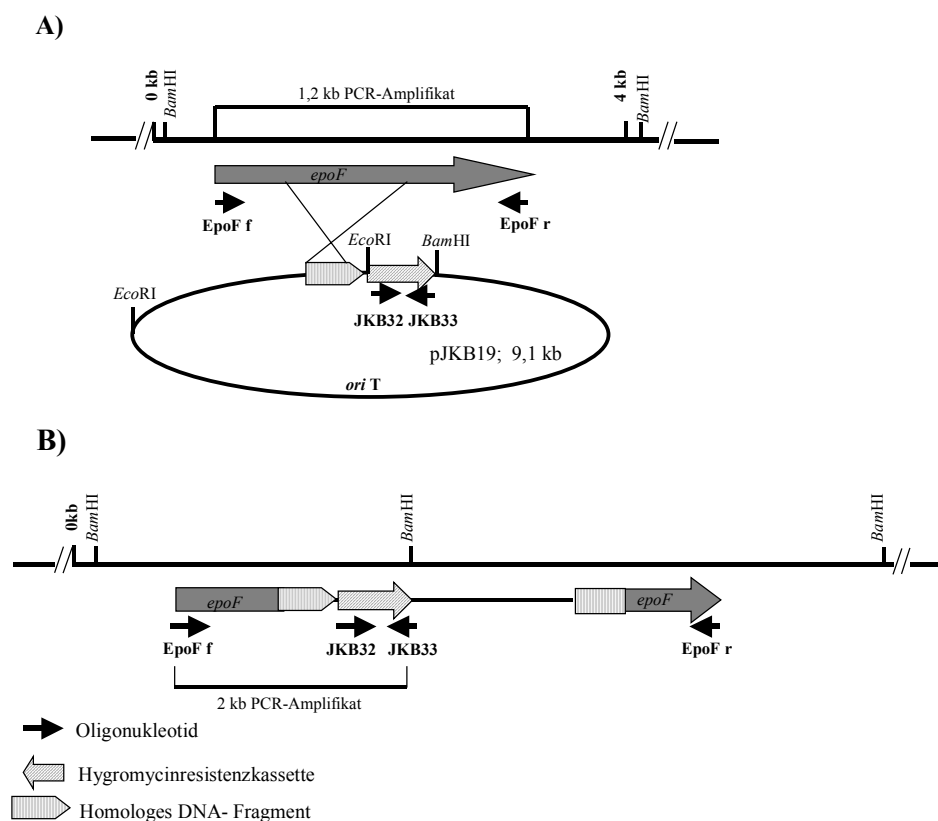


Abb. 29: Integration des Inaktivierungsplasmides pJKB19 im Genort *epoF*.

Gezeigt sind ausgewählte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und die Lage der in Abb. 30 (s. Text) verwendeten Oligonukleotide *epoFf*, *epoFr*, JKB32 und JKB 33 (s.2.4 Tab. 6). Zusätzlich angegeben ist die erwartete Größe der DNA-Amplifikate der durchgeführten PCR-Reaktion vor (A) und nach Integration des Plasmides pJKB30 (B).

Im Kontrollexperiment wurde ein weiteres Primerpaar verwendet (JKB 33/ *EpoF f*), die nur beim Übergang des integrierten Vektors im Genort *epoF* zu Signalen führen, da der Primer JKB 33 auf der Vektorsequenz von pJKB19 hybridisiert und so die korrekte Integration zeigt (s. Abb. 30). Das Ergebnis des PCR-Experiments ist in Abb. 30 gezeigt. Danach scheinen keine Mischklone vorzuliegen. *EpoF* ist nach diesen Ergebnissen für die Bildung des Epoxids der Epothilone A und B verantwortlich.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

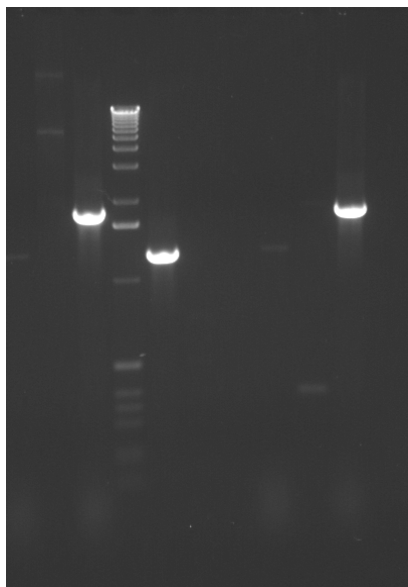


Abb. 30: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate zur genomischen DNA-Analyse der *epoF*-Transkonjuganten *S. cellulosum* So ce90JKB12 und JKB14.

Gezeigt ist das Gelphoto der aufgetragenen PCR-Reaktion. Spur 1: Matrize genomische DNA *S. cellulosum* So ce90 JKB12, Primer *EpoF* f+r. Spur 2: Matrize genomische DNA *S. cellulosum* So ce90 JKB12, Primer *EpoF*f+JKB33. Spur 3: Größenstandard 1kb. Spur 4: Matrize gen. DNA *S. cellulosum* So ce90, Primer *EpoF* f+r. Spur 5: Matrize gen. DNA *S. cellulosum* So ce90, Primer *EpoF* f+JKB33. Spur 6: Ansatz ohne DNA, Primer *EpoF* f+JKB33. Spur 7: Ansatz ohne DNA, Primer *EpoF* f+r. Spur 8: Matrize gen. DNA *S. cellulosum* So ce90JKB14, Primer *EpoF* f+r. Spur 9 : Matrize genomische DNA *S. cellulosum* So ce90 JKB14, Primer *EpoF* f+JKB33

4 Diskussion

Wirkung und Wirkungsspektren verschiedener Antibiotika und Cytostatika sind von Bakterien, Pilzen und Pflanzen optimiert und derart vielfältig, dass die Suche nach neuen Wirksubstanzen immer noch in der Isolierung aus natürlichen Quellen begründet ist. Eine bisher mit großem Aufwand untersuchte Quelle für bioaktive Naturstoffe ist neben Pilzen die Gattung *Streptomyces*. Rund 55% der bisher beschriebenen Sekundärmetabolite aus Bakterien entstammen dieser Gattung (Weber et al., 2003). In den letzten Jahren wurden die Myxobakterien als reiche Quelle an aktiven und strukturell sehr variablen Sekundärstoffen entdeckt. Die für diesen Reichtum verantwortlichen Enzyme sind in Myxobakterien oft Polyketidsynthasen und nicht-ribosomalen Polypeptidsynthetasen, die zuvor schon bei Actinomyceten und der Gattung *Bacillus* untersucht wurden. Gerade die Vielfalt der Isolate und das Vorkommen von hauptsächlich gemischten Genclustern von PKS und NRPS lassen Myxobakterien sowohl für die Isolierung von Naturstoffen, als auch für die genetische Arbeit lohnend erscheinen (Gerth et al., 2003). Ähnlich den Streptomyceten (Hopwood et al., 1997) konnte auch bei Myxobakterien der Hinweis erhalten werden, dass einzelne Produzentenstämme ein deutlich größeres genetisches Potential für die Biosynthese solcher Sekundärmetabolite besitzen, als man aus der Zahl der isolierten Substanzen vermuten konnte (Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 2001b). In der vorliegenden Arbeit wurde das genetische Potential des Myxobakteriums *S. cellulorum* So ce90, aus dem die Komponenten Epothilon und Spirangien isoliert wurden, auf die Fähigkeit zur Bildung weiterer Sekundärstoffe hin untersucht. Dabei sollte im Rahmen der Arbeit der Genlocus für die Bildung der Spirangiene identifiziert und durch ein System der gezielten Geninaktivierung näher charakterisiert werden.

Das genetische Potential für die Bildung an Sekundärstoffen des Typs Polyketid und Polypeptid

Screening der Cosmidgenbibliothek und Gruppierung der Cosmide

Das Genom von *S. cellulorum* So ce90 lag vor Beginn der Arbeit als eine rund 1600 Klone umfassende *E. coli*- Cosmidgenombibliothek vor. Dies entspricht einer sechsfachen Abdeckung des Genoms. Für die Suche nach rekombinanten Cosmiden, die Gene codierend für PKS und/oder NRPS enthalten, wurde diese Genbank durch Koloniehybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden untersucht (Beyer et al., 1999). Aufgrund der hochkonservierten Bereiche innerhalb bestimmter aktiver Domänen konnten degenerierte Oligonukleotide entworfen werden, mit deren Hilfe spezifische DNA-Fragmente aus dem Genom von *S. cellulorum* So ce90 und anderen Myxobakterien amplifiziert werden konnten. Diese wurden für die Experimente als Sonden bei der Hybridisierung verwendet (Beyer et al., 1999). Es sollten dabei Klone mit PKS oder NRPS codierenden Genbereichen Signale geben und die Suche im Genom erleichtern. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass Aminosäuremotive solcher Enzyme nicht nur bei Actinomyceten, sondern auch in Myxobakterien hochkonserviert sind und der Ansatz über PCR großen Erfolg verspricht und damit häufig Anwendung auf der Suche nach Genregionen, die für PKS oder NRPS codieren, verwendet werden (Weber et al., 2003). Aus der Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90 konnten 106 Cosmide identifiziert werden, die möglicherweise PKS- und NRPS-codierende Gene enthalten. Diese Cosmide wurden anschließend auf das Vorhandensein solcher Genregionen näher untersucht. Von den 106 rekombinanten Cosmiden konnten in Hybridisierungsexperimenten mit PKS- und NRPS-spezifischen Sonden 58, mit weiteren cosmid-spezifischen Sonden insgesamt 62 Cosmide identifiziert und zu insgesamt acht unabhängigen Gruppen zusammengestellt werden (s. Tab. 9, Tab. 10 und Abb. 31). Unter den acht Gruppen befinden sich, wie im Verlauf der Arbeit gezeigt werden konnte, das Epothilombiosynthesegencluster (Cos8, Molnar et al., 2000; Julien et al., 2000) und das Spirangienbiosynthesegencluster (A7). Bei den zusätzlich gefundenen Gruppen handelt es sich um Genregionen, für die bisher keine Funktion nachweisbar ist. Dieses Ergebnis bedeutet, dass *S. cellulorum* So ce90 das genetische Potential besitzt, um möglicherweise bis zu acht unterschiedliche Sekundärstoffe des Typs PKS und/oder NRPS zu bilden, obwohl bisher nur 2 Sekundärstoffe, das

Epithilon und Spirangien, aus diesem Stamm isoliert werden konnten. Dies geht konform mit den Ergebnissen, die bisher aus verschiedenen Stämmen der Gattung *Streptomyces* erhalten wurden. Schon vor der Sequenzierung des Genoms der Stämme *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces avermitilis* wurde die Meinung von Sir David Hopwood (Hoopwood, 1997) vertreten, dass Bodenbakterien, vorwiegend aus der Gattung *Streptomyces* mehr genetisches Potential für die Bildung von Sekundärstoffen besitzen, als man das wegen der aus ihnen isolierten Komponenten vermuten durfte. Hybridisierungs- und Sequenzierungsergebnisse weiterer untersuchter Stämme bestätigten dies. Danach wurden je bis zu acht mögliche Gencluster des Typs PKS oder NRPS gefunden, wobei nur je 1 oder 2 Sekundärstoffe aus diesen Organismen beschrieben waren (Sosio et al., 2000; Sun et al., 2002).

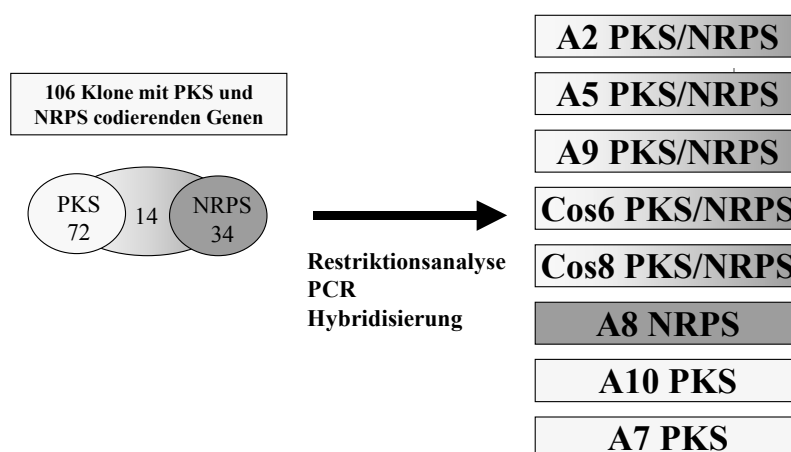


Abb. 31: Ergebnis der Gruppierung der Cosmidgenombibliothek von *S. cellulosum* So ce90.

Angegeben sind die Gruppennamen sowie die Hybridisierungsergebnisse mit PKS- und NRPS-codierenden Sonden

Auch in Myxobakterien werden in einigen Multiproduzentenstämmen diese Verhältnisse bestätigt. In dem untersuchten Stamm *St. aurantiaca* Sg a15, aus dem bisher das Myxalamid, die Aurachine und das Stigmatellin, sowie weitere Sekundärstoffe isoliert werden konnten, wurden mindestens 7-10 unterschiedliche Genloci detektiert (drei PKS homologe und vier PKS/NRPS-homologe Genloci), die für

die Bildung von Sekundärstoffen verantwortlich sind (Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 2001a, Silakowski et al., 2001b; Gerth et al., 2003). Hier wird vor allem deutlich, dass in Myxobakterien gemischte (Hybrid-) Gencluster des Typs PKS/NRPS keine Ausnahme darstellen, wie das bei Streptomyceten und anderen Gattungen der Fall ist (Du und Shen., 2001). Auch in *S. cellulorum* So ce90 zeigen fünf von acht Genloci gemischte Genclusterbereiche an. In einer anderen Arbeitsgruppe wurden zwischen sechs bis acht mögliche Genclusterbereiche für einen Epothilonproduzenten vorhergesagt (Santi et al., 2000). Bei den dort durchgeführten Experimenten wurde vermutet, dass bei einer geschätzten Genomgröße von 10 Mbp rund 320 kbp, also 3,2% im Genom von *S. cellulorum* So ce90 für Gene des Typs PKS und NRPS codieren. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit, einer geschätzten Genomgröße von 10,8 Mbp (Frank Gebhard, unveröffentlicht) und bei acht Genclusterbereichen von insgesamt ungefähr 400 kbp sollten rund 3,5% des Genoms für PKS und NRPS-homologe Gene codieren. Auch bei *St. aurantiaca* Sg a15 wird der Anteil an Genen, die für Sekundärstoffbiosyntheseenzyme codieren auf 3,2 bis 4,8 % geschätzt (Silakowski et al., 2001b). Damit würde der Anteil für die Bildung von Sekundärstoffen des Typs Polyketid und/oder Polypeptid etwas unter den 5% liegen, die für *Streptomyces coelicolor* nach Totalsequenzierung und Annotation gefunden wurden (Weber et al., 2003). Bei dem sequenzierten Stamm *Streptomyces avermitilis* codieren rund 6,4 % der DNA für PKS (Omura et al., 2001).

Möglicherweise wird das Genomprojekt von *S. cellulorum* So ce56, einem weiteren Multiproduzenten, weiteren Aufschluss über diese Zahlen geben (Pradella et al., 2002; Gerth et al., 2003), da mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht zwingend alle Genloci, die an Sekundärstoffbiosynthesen beteiligt sind, detektiert wurden.

Analyse sequenzierter Genloci aus der Genombibliothek von *S. cellulorum* So ce90

In der Sequenz der des A2 Genlocus konnten zwei offene Leserahmen (ORF 8 und ORF 9, s. Tab. 11) mit einer Größe von insgesamt 12 kb identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Homologie zu PKS und NRPS zeigen. Eine weitere

Analyse zeigte, dass sich aus dem Protein abgeleitet von ORF 8 ein Modul einer PKS mit den Domänen KS, AT, KR und ACP erkennen lässt. Das Protein aus ORF 9 stellt zwei Module einer NRPS dar mit den Domänen Cd, Ad, Ep (1x), und je einem PCP. Wenn man die konservierten Aminosäuremotive der einzelnen Domänen betrachtet, so könnte es sein, dass es sich hierbei um ein sog. kryptisches, inaktives Gencluster oder einem Teil davon handelt. Innerhalb der PKS wird der Austausch von Aminosäuren gegenüber den beschriebenen Motiven (Tang et al., 1998) gefunden. Innerhalb der NRPS werden im zweiten Modul die Kondensationsmotive C1- C6 statt der beschriebenen sieben Motive gefunden. Nur die Adenylierungsdomäne lässt alle bisher beschriebenen Motive erkennen (Konz et al., 1998). Durch Vergleiche mit anderen Adenylierungsdomänen, dessen zu aktivierende Substrate bekannt sind, lassen keinen eindeutigen Schluss zu. Möglicherweise wird in beiden Adenylierungsdomänen die Aminosäure Ornithin oder Tyrosin aktiviert (Stachelhaus et al., 1999; Challis et al., 2001). Zudem scheint kein typisches Lademodul der PKS sowie eine entsprechende TE- oder Reduktionsdomäne zur Freisetzung eines Metaboliten am Modul der NRPS vorhanden zu sein. Die in der Nähe von ORF 8 und ORF 9 gefundenen Gene (s. Tab. 11) lassen aber darüber spekulieren, ob in diesem Bereich ein Teil eines Tyrosin-abhängigen Biosyntheseweges beschriftet wird. Mit ORF 6, der starke Ähnlichkeit zu dem in Pflanzen gefundenen Gen *ddc*, welches eine L-DOPA-Decarboxylase codiert, konnte über heterologe Expression und Nachweis der Enzymaktivität der Umsatz von L-DOPA zu Dopamin bestätigt werden (Müller et al., 2000). Damit wurde in *S. cellulorum* So ce90 ein funktionelles Gen beschrieben, welches zuvor nur in Eukaryonten zu finden war. Vor dem Hintergrund der Ähnlichkeiten der abgeleiteten Proteine von ORF 4 und 5, einer Phenol-Hydroxylase und einer Aminotransferase könnte ein aromatisches Zwischenprodukt aus Tyrosin entstehen, welches nach entsprechender Aktivierung auch durch die Aktivität von PKS und NRPS weitermodifiziert werden könnte. Der Nachweis eines solchen Biosyntheseweges müsste in nachfolgenden Experimenten über markierte Bausteinverfütterung oder Expression des analysierten Bereiches erfolgen.

Die Analyse des Genlocus A5 konnte aufgrund der nicht zusammenhängenden Sequenzen und damit wahrscheinlich unzureichender Sequenzgenauigkeit nicht weiter im Detail betrachtet werden. Auch hier finden sich aber offene Leserahmen, die als

abgeleitete Proteine Homologie zu PKS und NRPS zeigen und damit zumindest einen Teil eines möglichen Biosynthesegenclusters darstellen. Interessant erscheinen dabei die Gene ORF 3 und ORF 7 des Contig 12 (s. Tab. 12). ORF 3 zeigt in seiner Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu einem eukaryontischen Enzym, einer Arachidonat-Lipoxygenase des Leukotrienweges. Welche Funktion dieses Gen in *S. cellulorum* So ce90 besitzt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden. Ebenso die Ähnlichkeit zu einer Acetyl-Xylan-Esterase, die möglicherweise bei der Degradation von Xylan, einem Bestandteil der Hemicellulose, wie bei den Gattungen *Streptomyces* und *Clostridium* (Kosugi et al., 2002) eine Rolle spielen könnte. Durch das Genomprojekt kann analysiert werden, ob dieses Gen auch in anderen Sorangien-Stämmen vorkommt. Eine Analyse des exprimierten Genes oder eine spezifische Inaktivierung dieses DNA-Bereiches könnte dann weitere Hinweise auf dessen Funktion geben.

Bei dem Genlocus Cos 6 handelt es sich um einen Teil eines Hybridgenclusters, das als inaktiv angenommen wird. Die Analyse des DNA-Bereiches erbrachte mit ORF 7 ein mögliches Insertionselement (s. Tab. 13; Perna et al., 2001), das den Leserahmen von ORF 6 in umgekehrter Orientierung liegend unterbricht. Die computergestützte Analyse ergab, dass sich der Leserahmen von ORF 6 um 204 Nukleotide verlängert, wenn der Leserahmen von ORF 7 mit den möglichen Insertionssequenzen und einer Sequenzwiederholung („Direct Repeat“) entfernt wird (s. 3.5.2). Damit sind ORF 6 und ORF 8 nur noch 59 statt 2586 bp voneinander entfernt. Die Vermutung, dass diese Sequenz bei der Erstellung der Cosmidgenombibliothek entstanden ist, konnte durch PCR-Analyse mit genomischer DNA aus *S. cellulorum* So ce90 widerlegt werden. Entsprechend den erhaltenen Ergebnissen durch PCR-generierte Amplifikate und Analyse der Sequenz ist dieses IS-Element im Genom von *S. cellulorum* So ce90 vorhanden. Damit sollte das Gencluster inaktiv sein. Da kein Hinweis gefunden wurde, dass dieses IS-Element an weiteren Genorten vorhanden ist und somit innerhalb weniger Generationen springt, scheint es nicht verwunderlich, dass in den PKS- und NRPS-codierenden Regionen nur wenige Domänen zuzuordnen sind. Der Genclusterbereich von Cos 6 erscheint daher kryptisch und nicht funktionell. Das Genprodukt von ORF 1 zeigt deutliche Ähnlichkeit zu einer Acetyl-CoA-Dehydrogenase aus *S. cellulorum* So ce 26 (SorE). Dieses Protein ist wahrscheinlich an

der Biosynthese des Soraphens mit der Bereitstellung von Hydroxymalonyl-CoA beteiligt (Ligon et al., 2002). Es wäre möglich, dass in *S. cellulorum* So ce90 eine ähnliche Reaktion katalysiert wird. Eine Homologie zur Zwittermicinresistenz ZmaR aus *B. cereus* zeigt das abgeleitete Protein aus ORF 3. Bei diesem Protein in *B. subtilis* handelt es sich um eine Acetyltransferase, die wenig Ähnlichkeit zu anderen bekannten Acetyltransferasen zeigt (Stohl et al., 1999a). Die Resistenz erfolgt durch die Acetylierung des Aminopolyol-Antibiotikums Zwittermicin, das häufig aus der Gattung *Bacillus* isoliert wird (Stohl et al., 1999b). Auch die Resistenz ist in dieser Gattung weit verbreitet. In dem Versuch, durch Hybridisierung dieses Genabschnittes aus *S. cellulorum* So ce90 gegen die genomische DNA verschiedener Myxobakterienstämme, sollte untersucht werden, ob dieses Gen auch in Myxobakterien verbreitet ist (s. 3.5.3). Dieser Aspekt erscheint interessant, da das Gen in *B. cereus* in direkter Nachbarschaft der für die Biosynthese von Zwittermicin codierenden Gene gefunden wird und ein Teil dieser Gene Homologie zu PKS- und NRPS-spezifischen Regionen zeigt (Stohl et al., 1999a; Emmert et al., 2004). Obwohl eine Acetyltransferase aus der Nachbarschaft des Myxalamidbiosynthesegenclusters aus *St. aurantiaca* Sg a15 bekannt ist, konnten unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen keine homologen Genregionen in den untersuchten Stämmen von *S. cellulorum* So ce10, So ce12, So ce1525, *St. aurantiaca* DW 4/3-1, Pde 68, S ga15 und *Archangium gephyra* Ar 7747 erkannt werden. Möglicherweise ist dieses Gen unter Myxobakterien nicht sehr verbreitet. Gene, die Acetyltransferasen codieren, könnten sich aber, wie in der Gattung *Bacillus*, auch deutlich in ihrer Sequenz unterscheiden und dennoch für dieselbe Reaktion verantwortlich sein. Ob es sich dabei um eine Resistenz handelt, müsste durch Untersuchungen der Katalysereaktion an einem rekombinant hergestellten und aufgereinigten Protein mit angebotenen Substraten gezeigt werden.

Weitere PKS- und NRPS- homologe Genloci

Neben dem Epothilombiosynthesegencluster (Molnar et al., 2000; Julien et al., 2000) und dem Spirangienbiosynthesegencluster, die nachfolgend diskutiert werden, konnten noch drei weitere Genloci, die im Falle von A8 NRPS-, A9 und A10 PKS-homologe Genregionen beinhalten, im Genom von *S. cellulorum* So ce90 detektiert werden.

Repräsentative Cosmide dieser Gruppen wurden nicht sequenziert, so dass nur vermutet werden kann, dass diese weitere voneinander unabhängige Genclusterbereiche darstellen. Nur von A8 kann durch die Hybridisierung und Gruppierung der entsprechenden Cosmide die Aussage getroffen werden, dass dieser Genlocus sich in direkter Nachbarschaft zum Epothilonbiosynthesegencluster befindet. Hybridisierungen an genomischer, hydrolysierte DNA, die über Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt wurde, unterstützen diese Aussage (Daten nicht gezeigt). Um eine Aussage über diese DNA-Bereiche bezüglich ihrer Funktionalität zu treffen, müssten DNA-Analysen sowie Inaktivierungen dieser Bereiche durchgeführt werden. Möglicherweise lassen sich dann durch den Vergleich des Biosynthespektrums der Mutanten mit dem Wildtyp bisher unentdeckte Sekundärstoffe detektieren, isolieren und in ihrer Struktur aufklären, wie dies auch bei dem Myxobakterium *St. aurantiaca* Sg a15 durchgeführt wurde (Silakowski et al., 2001a). Ob mit der Inaktivierung die Funktion geklärt werden kann, bleibt im Falle von stillen Genclustern, oder Genclustern, die unter den getesteten Kulturbedingungen nicht exprimiert werden, fraglich. Am Beispiel der hier analysierten DNA-Sequenzen lässt sich aber auch schon erkennen, dass viele Gene für die Regulation verantwortlich sind, wie z. B. Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche bis vor kurzem hauptsächlich in Eukaryonten bekannt waren. Diese sind in Myxobakterien, wie auch in Streptomyceten weit verbreitet (Umeyama et al., 2002). Genomprojekte sollten dabei nach und nach die Rolle der Regulatoren und die komplexen Netzwerke entschlüsseln, die unter anderem auch an der Biosynthese von Sekundärstoffen beteiligt sind. Interessant werden dabei auch die Verbreitung und Verwandtschaft einzelner Genclusterbereiche unter verschiedenen Stämmen von Myxobakterien sein, mit denen das Feld der Biokombinatorik beschriftet und erweitert werden kann.

Triparentale Konjugation unter Verwendung des Selektionsmarkers Hygromycin B

Um die Funktionalität ausgewählter Genloci zu untersuchen, wurde ein Geninaktivierungssystem verwendet, dass es ermöglicht, Rückschlüsse auf einzelne Biosyntheseschritte zu ziehen. Im Gegensatz zu den Methoden die für andere Myxobakterien wie *M. xanthus* und *St. aurantiaca* entwickelt wurden, ist der DNA-

Transfer in Sorangien bisher nur über die Konjugation beschrieben (Jaoua et al., 1992; Schupp et al., 1995; Pradella et al., 2002; Kopp et al., 2004). Da bisher keine autonom replizierenden Plasmide in Myxobakterien gefunden wurden (Pradella et al., 2002), muß die verwendete DNA in das Chromosom integrieren. Um nach erfolgter Konjugation Transkonjuganten zu selektionieren, wurde bisher der Selektionsmarker Phleomycin, ein Abkömmling des Bleomycins verwendet, da viele Sorangien-Stämme gegen Kanamycin, welches sonst z. B. bei *Stigmatella* angewendet wird, in hohem Maße resistent sind (Schupp et al., 1995, Molnar et al., 2000). Unsere Überlegungen, neue geeignete Selektionsmarker zu erproben, führte zu der Verwendung des Selektionsmarkers Hygromycin B (Pradella et al., 2002), das ursprünglich aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde und z. B. in der Veterinärmedizin Anwendung findet. Das Resistenzgen *hyg*^R, die Hygromycin-Phosphotransferase, stand in Form eines Ω -Interposons (Ω *hyg*, Prentki und Krisch, 1984; Blondelet-Rouault et al., 1997) zur Verfügung. Um zu gewährleisten, dass dieses Gen in Myxobakterien exprimiert wird, wurde es unter die Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes aus Tn5 gestellt, einem Promotor, der auch in Myxobakterien erfolgreich verwendet wurde (Silakowski et al., 1999, Beyer et al., 1999). Die getesteten Myxobakterienstämme waren im Bereich von 15-20 µg/ml sensitiv, wobei *Stigmatella aurantiaca* DW 4/3-1 eine etwas geringere MİK zeigte, als *S. cellulorum* So ce90, die wahrscheinlich für einzelne Stämme neu ermittelt werden muß. Dies scheint vor allem mit den für die Kultivierung verwendeten Medien (Salzkonzentration), sowie dispersem Wachstum und der Bildung von Transportsystemen (Efflux) in Zusammenhang zu stehen, die die Wirkung und Bioverfügbarkeit beeinflussen. Das Konstrukt pJKB10 (s. 2.10 und Tab.4; Pradella et al., 2002) zeigte in durchgeführten Experimenten eine Resistenzvermittlung in *E. coli* und *Stigmatella aurantiaca* DW 4/3-1 von bis zu getesteten 150 µg /ml an Hygromycin B. Konstrukte für die spezifische Geninaktivierung beruhten auf den mobilisierbaren Plasmiden pSUP1021 und pSUP102 (Simon et al., 1983; Simon et al., 1986; s. Tab.3 und 2.10), Derivate des Plasmides RP4, die bereits für den konjugalen DNA- Transfer in verschiedene Myxobakterienstämme beschrieben wurden (Breton et al., 1985; Glomp et al., 1988, Jaoua et al., 1992; Schupp et al., 1995). Bei einer für die Selektion verwendeten Konzentration von 60 µg/ml an Hygromycin B konnten Hygromycinresistente Klone erhalten werden, die in den durchgeführten Analysen des

Genotyps die Integration der verwendeten Plasmide am gewünschten Ort zeigten (s. 2.10). Somit konnte gezeigt werden, dass das Aminoglykosid Hygromycin B sich als Selektionsmarker für Sorangien eignet. Für den DNA-Transfer wurde eine triparentale Konjugation verwendet. Konjugationen die biparental, mit dem für den Transfer ausgestatteten Genen *E. coli* ET12567 pUB307 (Flett et al., 1997), welcher das Inaktivierungsplasmid trägt, durchgeführt wurden, erbrachten keine Transkonjuganten. Das Plasmid pUB307 (Bennet et al., 1977), ein Derivat des Plasmides RP1, liefert dabei die Transfer-Gene, um mobilisierbare Plasmide (mit *oriT*) in einen Rezipienten zu transferieren. Der *dam/dcm* negative Stamm *E. coli* ET12567 pUB307 (Flett et al., 1997), der DNA nicht methyliert, wurde schon mit hoher Effizienz benutzt, um DNA in Streptomyceten zu transferieren. Streptomyceten erkennen methylierte DNA und hydrolysieren diese. Auch bei Myxobakterien werden Restriktionsendonukleasen vermutet, die methylierte DNA als fremd erkennen und hydrolysieren, so dass diese nicht mehr für eine homologe Rekombination zur Verfügung steht. Scheinbar ist die Effizienz der DNA-Übertragung auf *S. cellulosum* So ce90 nicht hoch genug, um nach der Konjugation transformierte Zellen zu erhalten (Pradella et al., 2002), obwohl die biparentale Konjugation bei dem Stamm *S. cellulosum* So ce56 funktioniert (Kopp et al., 2004). Für die triparentale Konjugation wurde zusätzlich das Helferplasmid RK600 in *E. coli* HB101 (de Lorenzo et al., 1994) verwendet. Obwohl damit das Helferplasmid pUB307 nicht mehr notwendig ist, wurde für alle Konjugationsexperimente weiterhin der Stamm *E. coli* ET12567 mit pUB307 verwendet. Hier liegt ein Problem, das für einzelne Stämme der Gattung *Sorangium* eine Modifikation des Konjugationsprotokolls notwendig macht, da es sich gezeigt hat, dass einzelne Stämme in der für die Konjugation verfügbaren Zeit und mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen an *E. coli*- Zellen höchst unterschiedlich reagieren (Kopp et al., 2004). Inzwischen wurden neue Versuche durchgeführt, die das Generieren von Transposon- Mutantenbanken erlauben. Mit modifizierten Transposons aus der *mariner*-Familie wird inzwischen erfolgreich versucht, Genloci, über die bisher keine Sequenzinformation vorliegt, durch Inaktivierung zu untersuchen (Rubin et al., 1999, Sandmann et al., 2002; Kopp et al., 2004). Auch für *S. cellulosum* So ce90 wurde eine Transposon-Mutagenese durchgeführt (Julien und Fehd, 2003). Bei Multiproduzentenstämmen können so in

kurzer Zeit die Genloci untersucht werden, die für die Biosynthese einzelner Sekundärstoffe verantwortlich sind, ohne stille Gencluster berücksichtigen zu müssen.

Identifizierung des Spirangienbiosynthesegenclusters

Die Struktur der aus *S. cellulosum* So ce90 und anderen Stämmen isolierten Spirangiene entspricht im Aufbau einem Polyketid (s. Abb. 4). Es konnte daher vermutet werden, dass dieses Molekül durch eine Polyketidsynthase, wahrscheinlich des Typs I biosynthetisiert wird. Neben den Genloci A9 und A10, die nur Hybridisierungssignale gegen PKS-homologe DNA- Sonden gezeigt hatten, wurde mit A7 ein weiterer DNA-Abschnitt sequenziert, welcher scheinbar viele PKS-Signale bei den Hybridisierungen zeigte. Auf der Sequenz von 62 kb, die aus den überlappenden Cosmiden 71 und 66 erhalten wurde, konnten insgesamt 15 vollständige und ein unvollständiger offener Leserahmen identifiziert werden. Abgeleitete Proteine des ersten unvollständigen und der drei darauffolgenden offenen Leserahmen von 42 kb zeigten dabei eine deutliche Homologie zu bekannten Polyketidsynthasen, wie z. B. der Soraphen-Polyketidsynthase (s. Tab. 14). Eine detaillierte Analyse zeigte, dass sich diese Proteine in 8 vollständige und ein unvollständiges Modul mit PKS typischen Domänen unterteilen lassen. Die Reihenfolge und eine am Ende des letzten PKS-ähnlichen Proteins gefundene Thioesterasedomäne, gaben Anlaß zu der Spekulation, dass es sich hierbei um den terminalen Teil der Spirangiensynthase, einer Polyketidsynthase des Typ I, handelt (s. Tab. 15). Das Vorhandensein von zusätzlichen Domänen, die an der Reduktion der entstandenen Ketofunktion der wachsenden Polyketidkette beteiligt sind, unterstützten diese Hypothese. Die mögliche Beteiligung an Teilen der Biosynthese des Spirangiens der gefundenen Proteine ist in Abb. 32 gezeigt. Mit der erfolgten Inaktivierung des Gens *spiH* wurden Mutanten erhalten, die kein Spirangien mehr produzierten. Dies war der Nachweis, dass es sich tatsächlich um einen Teil der an der Spirangienbiosynthese beteiligten Gene handelt. Wenn man den Vergleich zu anderen Polyketiden zieht, die von modularen PKS synthetisiert werden, kann man vermuten, dass insgesamt 1 Lademodul und 15 Module für die Kettenverlängerung benötigt werden. Diese sollten insgesamt neun Acetat- und sieben Propionateinheiten in Form von Malonat und Methylmalonat für die Biosynthese von Spirangien A zusammenfügen. Ein direkter

Nachweis hierfür, in Form von Fütterungsexperimenten mit markierten Bausteinen, die während der Kultivierung gefüttert werden, nicht erfolgt um die Hypothese zu stützen. Eine Analyse der hier detektierten AT-Domänen unterstützt jedoch das vorgeschlagene Biosyntheseschema unter der Beteiligung von SpiG bis SpiJ. Die AT-Domänen von SpiG2 und SpiH1 zeigen eine deutliche Übereinstimmung zur Konsensussequenz von AT-Domänen, die für den Einbau von Methylmalonat verantwortlich sind. Entsprechend ist eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zu AT-Domänen, die Malonat einbauen der restlichen AT-Domänen von SpiH2 bis SpiJ2 zu erkennen (s. Abb. 13; nach Ligon et al., 2002). Dies scheint nicht in allen Genclustern der Fall zu sein. Häufig können solche Zuordnungen gerade in Hybrid- Genclustern nicht vollzogen werden (Silakowski et al., 2001b). Alle Domänen wurden in ihrer Aminosäuresequenz untersucht und entsprechend beschriebener konservierter Aminosäuremotive zugeordnet (s. Tab. 17, Tang et al., 1998; Molnar et al., 2000). Es stellte sich dabei heraus, dass in allen Domänen die entsprechenden Motive gefunden wurden, die für die Funktionalität des untersuchten Bereiches stehen. Auch die fünf DH-Domänen, die wohl für die Biosynthese der Pentaenstruktur verantwortlich sind, konnten identifiziert werden. Keine dieser Domänen aus dem Bereich scheint inaktiv oder überzählig. Überzählige oder möglicherweise inaktive Domänen sind in anderen Biosynthesegenclustern wie z. B: dem Epothilonbiosynthesegencluster beschrieben (Molnar et al., 2000). Es wurden keine weiteren Sequenzierungen durchgeführt, da in der Cosmidgenbibliothek keine 5'-Anschlußcosmide detektiert werden konnten, die eine minimale Überlappung gewährleisten. Dazu müsste die Bank erweitert werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Ausgehend von den 42 kb und der durchschnittlichen Größe von rund 4-5 kb, in denen ein Modul codiert sein sollte, müsste die fehlende DNA-Sequenz noch einmal rund 35 kb betragen. Dies wäre dann eine Gesamtgröße von 75 bis 80 kb, in der die Spirangiensynthase codiert wäre und somit eines der größten bisher beschriebenen Gencluster aus Myxobakterien darstellen. Dies wäre in Übereinstimmung mit dem Ergebnis, dass in einer anderen Arbeitsgruppe ein PKS- Gencluster von über 70 kb im Epothilonproduzenten *S. cellulosum* SM44angenommen wurde (Santi et al., 2000). Es stellt sich natürlich die Frage, wie die Strukturen der Spirangiene C und D (s. Abb. 4) entstehen, die eine Methylgruppe mehr gegenüber Spirangien A und b besitzen..

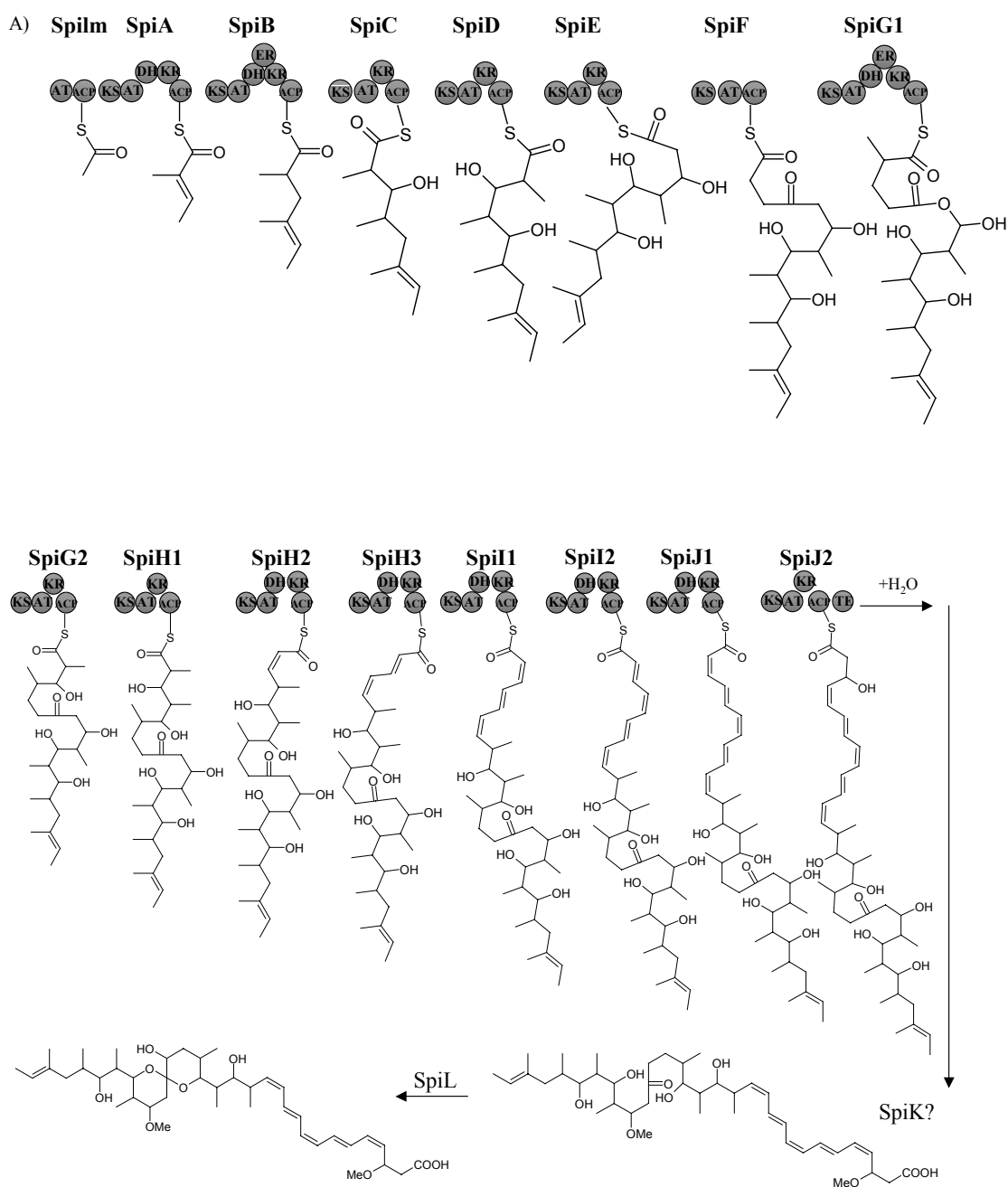


Abb. 32: Hypothetischer Aufbau der Spiranginsynthase und mögliche Spirangienbiosynthese.

A) Gezeigt ist der mögliche Aufbau der bisher noch nicht identifizierten 8 Module (hier Spiilm bis SpiG1) der Spiranginsynthase mit Lademodul (Im). Der modulare Aufbau wurde aus der Struktur des Spirangien A abgeleitet. B) Gekennzeichnet sind die identifizierten Module SpiG2 bis SpiJ der Spiranginsynthase, sowie zusätzlich die mögliche Funktion von SpiK und SpiL mit einer Hydroxylierung und zwei möglichen O-Methylierungen. Die Bildung des Spiroketals erfolgt möglicherweise mit der Hydroxylierung durch SpiL.

Dazu müsste das Lademodul untersucht werden. Wahrscheinlich ist, dass dieses Lademodul nicht nur Acetyl-CoA sondern auch Propionyl-CoA als aktivierte Startereinheit akzeptiert. Lademodule, die ein größeres Spektrum an Startermolekülen akzeptieren, sind aber, wie mit dem Startermodul der DEBS, sowie dem Avermectin, Myxothiazol und dem Myxalamid bekannt (Staunton und Weissman, 2001, Höpke und Moore, 2001; Silakowski et al., 2001a). Interessant ist dabei der Aspekt, dass die restlichen Proteine in der Lage sind, unterschiedliche Kettenlängen und Konformationen (Spirangien A/B und C/D, *cis-trans* Isomere; s. Abb. 4) zu akzeptieren und zu prozessieren.

In direkter Nachbarschaft am 3'-Ende konnten weitere Leserahmen identifiziert werden. Das Gen *spiK* besitzt als abgeleitetes Protein starke Ähnlichkeit zu bekannten S-Adenosylmethionin (SAM-) abhängigen O-Methyltransferasen (s. Abb. 14 und Tab. 13). In der Struktur der Spirangiene können zwei Positionen beschrieben werden, an denen eine entsprechende Methylierung erfolgt (Position 3 und Position 23, s. Abb. 4). Da nicht die gesamte Genclustersequenz vorhanden ist, kann nur vermutet werden, ob dieses Protein beide Methylierungen durchführt. Wie in Abb.14 dargestellt, sind alle drei Motive (I-III) vorhanden, die nach Kagan und Clarke (1994) für die Bindung von SAM notwendig sind. Die Methyltransferase sollte somit funktionell sein. Mit Hilfe einer Inaktivierung von *spiK* sollte diese Frage geklärt werden. Es konnten aber keine Klone erhalten werden, was sicherlich an der geringen Effizienz der homologen Rekombination mit kleinen DNA-Fragmenten liegt. Viele Methyltransferasen sind aus den unterschiedlichen Biosynthesen von Sekundärstoffen bekannt. Einige von ihnen sind N- oder C-Methyltransferasen (Lozano et al., 2000; Molnar et al., 2000). O-Methyltransferasen sind sowohl als einzeln transkribierte Gene, wie bei MycJ aus der Biosynthese des Mycrocystin (Christiansen et al., 2003) oder Stigmatellin (Gaitatzis et al., 2002) bekannt. Auch innerhalb von Domänen von Polyketidsynthasen werden Methyltransferasen gefunden (Silakowski et al., 1999; Weinig et al., 2003b). Häufig sind Methyltransferasen nur an einer Methylierung beteiligt. Z. B. wird in der Biosynthese des Microcystin nur ein Methylierungsschritt katalysiert (Christiansen et al., 2003). In den Fällen, in der das Gen in die PKS-Domänen eingebettet ist, liegt für jeden Schritt eine in die Biosynthese involvierte Methyltransferase vor (Miller et al., 2002; Weinig et al., 2003b). Eine erfolgreiche Inaktivierung eines homologen oder

heterolog exprimierten Spirangienbiosynthesegenclustern und Vergleiche der vollständigen DNA-Sequenz sollte die Frage klären, an welchen Katalyseschritten SpiK beteiligt ist.

SpiL ist eine Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase

Mit SpiL wurde ein Protein gefunden, das deutliche Ähnlichkeit zu bekannten Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen zeigt (s. Tab. 14). Überraschend ist dabei die Ähnlichkeit zu Oxygenasen der Gattung *Nostoc* und *M. xanthus*, nicht aber zu EpoF, der Monooxygenase des Epothilombiosynthesegenclusters, das im gleichen Genom vorliegt. Anhand der Struktur des Spirangiens lässt sich eine von SpiL katalysierte Reaktion vermuten, da unter der Annahme eines zwischen Position 19 und 22 erfolgten Einbaus einer C₂-Einheit keine Hydroxylgruppe an Position 20 vorhanden sein dürfte (August et al., 1998, Staunton und Weisman., 2001; s. auch Abb. 3). Um SpiL die o. genannte Reaktion zuweisen zu können, wurde eine Inaktivierung von *spiL* erfolgreich durchgeführt. Der erhaltene Kulturextrakt aus der Mutante *S. cellulosum* So ce90 JKB19 wurde anschließend über HPLC-Analyse überprüft. Neben einer größeren Menge an Zerfallsprodukten (Dr. Steinmetz, pers. Mitteilung; Retentionszeit um 20 min.), die ein Spirangienähnliches Absorptionsspektrum zeigen, waren die Retentionszeiten der vermuteten Spirangiene zur polaren Seite des HPLC- Laufes verschoben (25-29 min.; s. Abb. 23). Da den erwarteten Spirangienstrukturen eine Hydroxylgruppe fehlen sollte, war dieses Phänomen nicht zu erklären. Aus einer 70 l Fermentation konnte genügend Material für eine HPLC-MS und NMR- gestützte Analyse und Strukturaufklärung gewonnen werden. Über die Massenspektrometrie konnten aus dem Signal mit der Retentionszeit 26 min. zwei Massen erhalten werden, die die relative Molmasse 706 und 838 besitzen. Die Spirangiene A und B besitzen die relative Masse M 702, Spirangien C und D die relative Masse M 716. Auch damit konnte das Fehlen einer Hydroxylgruppe (M= X-16) nicht erklärt werden. Aus der Strukturaufklärung konnten schließlich die zu den Massen gehörenden Strukturen bestimmt werden (s. Abb. 24). Bei der kleineren Masse handelt es sich um eine offenkettige Variante des Spirangiens A, die keine Spiroketalstruktur besitzt. Bei der Struktur der Masse 838 handelt es sich um ein glykosyliertes Produkt. Beiden Strukturen gemeinsam ist das Fehlen der Hydroxylgruppe an Position 20. Damit konnte die Funktion von SpiL bei der Biosynthese der Spirangiene nachgewiesen werden. Die

Pentose, die an Position 27 gefunden wurde, ist bisher nur bei Icumazol B beschrieben (Reichenbach et al., Patent DE 4305486, 1994). Auch konnten bisher aus dem Stamm *S. cellulorum* So ce90 keine glykosylierten Sekundärstoffe isoliert werden (Gerth, pers. Mitteilung). Es stellt sich damit die Frage, ob diese wahrscheinlich unspezifische Glykosylierung aus einer anderen Sekundärstoffbiosynthese stammt und ob *S. cellulorum* So ce90 möglicherweise die Gene für die Icumazolbiosynthese besitzt. Die Glykosylierung ist auch nur möglich, da das Substrat (Spirangien X) an der Position 27 eine freie Hydroxylgruppe besitzt, die normalerweise durch die Spiroketalbildung nicht vorhanden wäre. Es stellt sich damit die Frage, wie die Bildung des Ketals katalysiert wird, da von diesem Bereich keine Sequenzdaten vorhanden sind. Die Struktur des Ketals ist dem des Avermectins, welches aus *Streptomyces avermitilis* isoliert wurde (Ikeda und Omura, 1997, Yoon et al., 2004) sehr ähnlich (vgl. Abb. 33). Das Avermectinbiosynthesegencluster, das eine Länge von über 80 kb besitzt, wurde in der japanischen Gruppe sequenziert und analysiert. Hier wurde auch ein Vorschlag für die Bildung des Spiroketals beschrieben (Ikeda und Omura, 1997), der in Abb. 33 neben der isolierten Spirangien X- Struktur aufgezeichnet ist.

Um die vorgeschlagene Reaktion beim Spirangien nachzuvollziehen, müsste sich an Position 21 des Moleküls eine Ketogruppe befinden, die laut Strukturanalyse nicht vorhanden ist. Möglicherweise stammt die gefundene Hydroxylgruppe aber aus der Aufarbeitung. Dies konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Höfle nicht ausschließen (Dr. Steinmetz, pers. Mitteilung). Mit der Analyse der noch fehlenden DNA-Sequenz sollte es aber möglich sein, zu erfahren, welcher Biosyntheseschritt an dieser Stelle vollzogen wird (vgl. Abb. 32) und in dem verantwortlichen Modul wahrscheinlich nur die Domänen KS, AT und ACP zu finden sind, die eine Ketogruppe belassen würden. Die Rolle der durch SpiL eingeführten Hydroxylgruppe ist dabei aber nicht ganz klar. Es ist möglich, dass die Reaktion der Spiroketalbildung durch einen $-I$ Effekt der Hydroxylgruppe begünstigt oder überhaupt möglich gemacht wird um an der Ketogruppe an Position 21 eine erhöhte Reaktivität zu erzeugen. Diese Annahme entspricht den Verhältnissen bei Avermectinen, bei denen entweder eine Doppelbindung ($-I$ Effekt) zwischen Kohlenstoff 22 und 23, oder eine OH-Gruppe an Position 23 gefunden wird (Ikeda et al., 1999, Yoon et al., 2004). Hinweise auf

zusätzliche Enzyme, die an einer solchen Reaktion beteiligt sind, wurden bisher nicht gefunden.

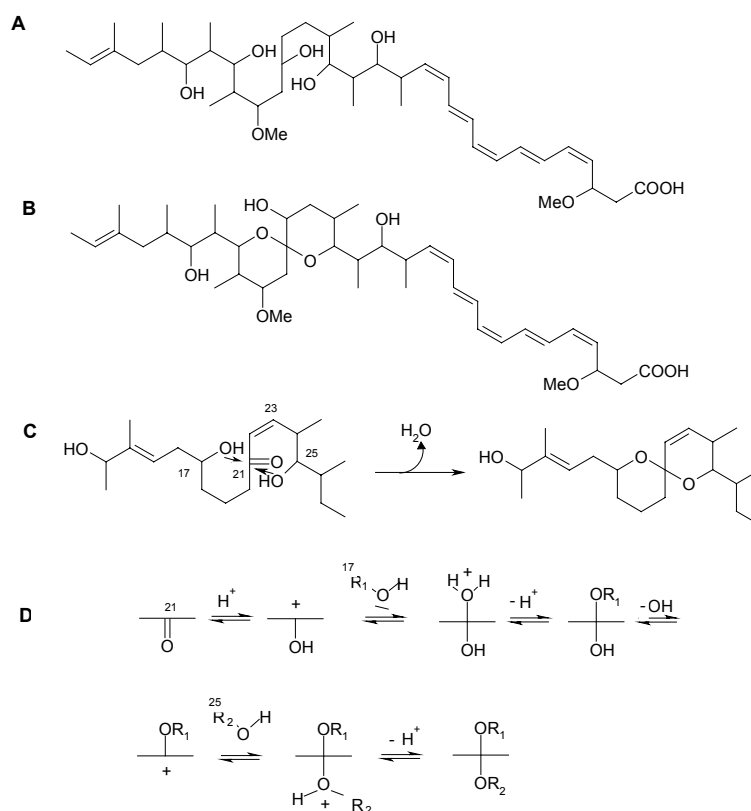


Abb. 33: Struktur von Spirangien A und des isolierten SpirangienX und Spekulation zur Spiroketalbildung des Avermectins.

A: Struktur des aus der Mutante *S. cellulosum* So ce90 JKB19 isolierten Sipsrangien X. B: Struktur von Spirangien A. C: Wahrscheinliche Verhältnisse der Spiroketalbildung bei Avermectinen. D: Vorgeschlagener Mechanismus der Spiroketalbildung bei Avermectinen, nach Omura und Ikeda 1997. Angegeben sind zusätzlich Numerierungen wichtiger Positionen von Kohlenstoffatomen des Avermectins.

SpiZ ist ein Regulator der Spirangienbiosynthese

Mit dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Protein SpiZ, welches in entgegengesetzter Orientierung zu SpiL gelegen ist, wird ein möglicher Regulator der Familie der ECF-Sigma-Faktoren (Lonetto et al., 1994) gefunden. Diese zu den σ -70 Faktoren gehörenden Regulatoren (Lonetto et al., 1994, Wösten et al., 1998) sind an einer Reihe von Regulons beteiligt, mit denen die Zelle auf Verhältnisse außerhalb des Zytoplasmas reagiert (Missiakis und Raina, 1998; Helmann, 2002). Da *spiZ* in der Nähe des Spirangienbiosynthesegenclusters gefunden wurde und einige ECF-Sigma-Faktoren

auch Sekundärstoffbiosynthesen regeln, wie die Carotinoidbiosynthese bei *M. xanthus* (Gorham et al., 1996; Browning et al., 2003; s. 1.7), wurde hier eine mögliche Regulation der Spirangienproduktion vermutet. Die erfolgreiche Inaktivierung von *spiZ* führte zu Mutanten, die kein Spirangien mehr produzierten. Somit stand fest, dass SpiZ an der Regulation des Spirangienbiosyntheseegenclusters beteiligt ist. Ein polarer Effekt der Inaktivierung wurde ausgeschlossen, da erstens *spiZ* in umgekehrte Richtung zum Spirangienbiosyntheseegencluster liegt und damit wohl unabhängig transkribiert wird und zweitens auch *spiL*- Mutanten noch Spirangiene produzierten. SpiZ wurde daraufhin näher analysiert. Der Vergleich von SpiZ in den Datenbanken erbrachte eine hohe Ähnlichkeit mit CarQ aus *M. xanthus* (s. Abb. 16 und Tab. 18). Es zeigte sich jedoch, dass SpiZ deutlich größer war, als das mit ihm verglichene Protein. Für *spiZ* wurden in der Sequenz drei mögliche Startcodons gefunden (I- III), die zu einer maximalen Größe von 251 Aminosäuren (Startcodon I) gegenüber den 174 Aminosäuren von CarQ führen würden. Vor allen drei Startcodons befindet sich eine mögliche Ribosomenbindestelle. GAGGGGAG vor Start I, GAAAG vor Startcodon II und GAAAAA vor Startcodon III, im Abstand von 8 (I), 7 (II) und 6 (III) Nukleotiden vor dem ATG. Vom Vergleich zu bisher beschriebenen Ribosomenbindungsstellen scheint der Start I, mit dem das größte Protein gebildet würde, der wahrscheinlichste zu sein. Auch mögliche Promotorsequenzen (-10, -35-Region) werden vor dem hier beschriebenen DNA-Bereich gefunden (s. Tab. 19). Da bisher nur wenig über Promotoren in Myxobakterien bekannt ist (Martinez-Argudo., 1998), wie im Falle von CarQ, der seine eigene Transkription steuert, kann ein möglicher Promotor nur vermutet werden. Um dieses zu klären, müsste SpiZ z. B. heterolog exprimiert und DNA-Bindestudien durchgeführt werden, Experimente, die bei CarQ zur weiteren Charakterisierung erfolgreich waren (Browning et al., 2003). Auch Versuche unter Verwendung bekannter Promotoren und Enzym-essays, oder RT-PCR, könnten weiteren Aufschluß auch über den zeitlichen Verlauf der Expression erbringen. Weitere Analysen können sicherlich durchgeführt werden, wenn die vollständige Genclustersequenz vorliegt und damit geklärt werden kann, auf welches Signal SpiZ reagiert und ob es nur ein Teil einer Signaltransduktionskaskade ist, oder direkt vor dem Biosyntheseegencluster bindet. Auch ein möglicher Anti- Sigma-Faktor, der bei einigen Faktoren negativ regulierend wirkt, konnte bisher nicht gefunden werden. Da ECF-

Sigma-Faktoren in ihrer Aminosäuresequenz sehr divergent sind, lässt sich aus den Analysen nur wenig ableiten. Es wurde aber durch Vergleiche zu anderen Sigma-Faktoren versucht, neben dem Konsensusmotiv der ECF-Sigma-Faktoren (PROSITE Nr.: PD0C00592) weitere Regionen des Proteins zu bestimmen (s. Abb. 34).

Bei Sigma-70-Faktoren konnten bestimmte konservierte Regionen beschrieben werden, die die Funktionalität des Proteins bestimmen. Die Region 1 ist an der Bildung des Startkomplexes beteiligt. Diese Region ist bei ECF-Sigma-Faktoren am wenigsten konserviert (Wösten, 1998; Helmann, 2002) und lässt damit keine Rückschlüsse auf den Start von *spiZ* zu. Die bekannteste Region ist Region 2, die zur Bindung an das Polymerase-Core-Enzym (Region 2.1 und 3) benötigt wird. Region 2.4 ist an der Erkennung des –10 Promotorbereichs beteiligt und dient damit bei Vergleichen der Zugehörigkeit zur ECF- Familie. Der DNA- Kontakt (Helix-turn-Helix-Motiv) und die Erkennung der –35 Region ist in der Region 4.1 und 4.2 codiert (Wösten, 1998).

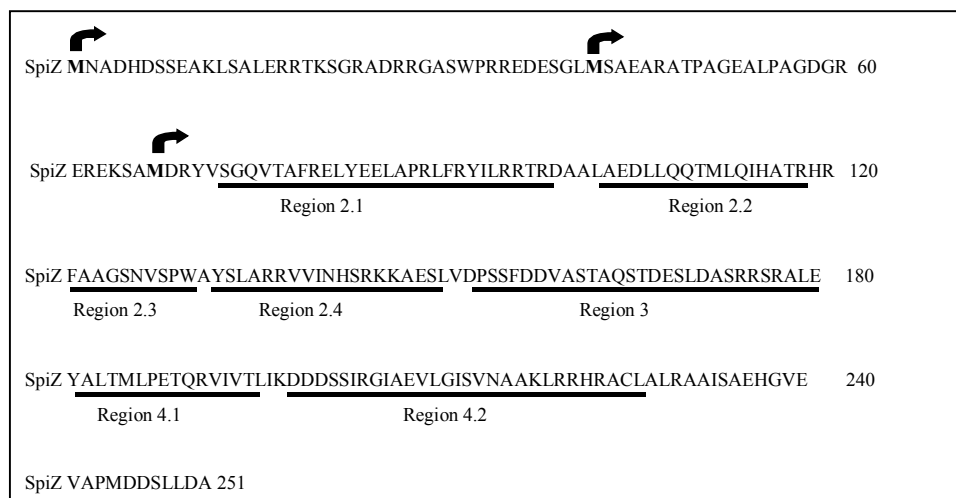


Abb. 34: Aminosäuresequenz und konservierte Regionen von SpiZ

Angegeben ist die größtmögliche Aminosäuresequenz von SpiZ, sowie konservierte Regionen von Sigma 70- und ECF- Sigma- Faktoren (nach Lonetto et al., 1994). Zusätzlich sind drei mögliche Startcodons durch Pfeile gekennzeichnet. Erläuterungen siehe Text.

Obwohl ECF-Sigma-Faktoren zuerst nicht als Regulatorproteine erkannt wurden, spielen sie in verschiedenen Organismen eine große Rolle. Sie regulieren häufig mehr

als eine bestimmte Biosynthese und sind an der Bildung von Virulenzfaktoren (*P. aeruginosa*; Wilson und Lamont, 2000), Antibiotika (Actinomycin), weiteren Sekundärstoffen (Carotinoide, Siderophore), der Antwort auf Stress durch Antibiotika, Salzkonzentration und Hitze, oder Zelldifferenzierung beteiligt (Missiakis und Raina, 1998, Raivo und Silhavy, 2001, Kojima et al., 2002; Übersicht: Helmann, 2002). Mit Hilfe der Genomsequenzierungsprojekte können in der Zwischenzeit viele mögliche ECF- Sigamfaktoren gefunden werden. In *Pseudomonas putida* konnten bisher 19 mögliche Sigma- Faktoren der ECF- Familie detektiert werden (Martinez-Bueno et al., 2002). Bei *Streptomyces coelicolor* sind es wahrscheinlich 50 (Mittenhuber, 2002). Welche Rolle sie im Netzwerk der Regulation spielen, muß erst noch überprüft werden. Neue Erkenntnisse sind daher auch von Ansätzen mit DNA-Microarray gestützten Bindungsstudien, wie bei *Bacillus subtilis* (Asai et al., 2003) zu erwarten. Mit Hilfe solcher Techniken sollte es möglich sein, die Signalkaskade zu untersuchen, die zur Expression von *spiZ* und damit zur Bildung der Spirangiene führt. Noch ist nicht klar, welche Signale, Aminosäuren, Licht oder andere Mediatoren zur Biosynthese der fungizid wirkenden Spirangiene führen, oder ob die Bildung nur Wachstumsphasenabhängig ist.

Weitere offene Leserahmen stromabwärts der *spi*-Gene

Stromabwärts des Spirangienbiosynthesegenclusters konnten weitere Leserahmen identifiziert werden. Vier Gene zeigen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen in den Datenbanken. Diesen Proteinen kann somit keine Funktion zugeschrieben werden. Interessanterweise finden sich diese Gene in derselben Anordnung bei *S. cellulorum* So ce56 wieder, einem Myxobakterium, dessen Gneomsequenzierung gerade durchgeführt wird. Ob spätere Annotationen und Untersuchungen dieses Bereiches zu funktionellen Charakterisierungen führen, bleibt abzuwarten. Vier weitere offene Leserahmen zeigen in ihrer Proteinsequenz Ähnlichkeit zu Proteinen, die für die Biosynthese von Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ) verantwortlich sind. Viele Gram-negative Bakterien nutzen PQQ als Co-Faktor von Chinonproteinen, wie Methanoldehydrogenasen, mit deren Hilfe Methanol zu Formaldehyd oxidiert wird (Oubrie und Dijkstra, 2000). PQQ wird dazu in den periplasmatischen Raum

transportiert, in dem solche Chinonproteine lokalisiert sind. Die exprimierten Gene, die für die Biosynthese verantwortlich sind, kommen in verschiedenen Organismen in unterschiedlicher Anzahl vor. Sie sind an den enzymatischen Schritten der Biosynthese von PQQ aus Glutamat und Tyrosin, sowie dessen Transport in den periplasmatischen Raum beteiligt (Stites et al., 2000). In *Acinetobacter cacoaceticus* sind für die Biosynthese vier Gene, in *Methylobacterium extorquens* sieben Gene beschrieben (Oubrie und Dijkstra, 2000). Chinonproteine, wie Methanoldehydrogenasen oder lösliche Glucosedehydrogenasen sind aus *S. cellulosum* So ce90 nicht bekannt. Auch konnte Pyrrolochinolin-Chinon bisher nicht aus diesem Organismus isoliert werden. Ob diesen Genen eine solche Funktion zukommt, muß noch näher untersucht werden.

Mögliche Evolution der Spirangiensynthese

Bei der Analyse der terminalen DNA-Sequenz des Spirangienbiosynthesegenclusters fielen nach dem Vergleich der DNA-Sequenz mit sich selbst 2 große Bereiche auf, die einen Direct Repeat anzeigen. Die DNA-Sequenzen waren rund 8,3 kb lang und zeigten eine Identität von 91%. Innerhalb dieser Sequenz konnten aber Bereiche gefunden werden, die bis zu 2400 Nucleotide lang waren und eine fast 99%ige Identität aufweisen. Die beiden großen Bereiche wurden 1a und 1b genannt. Codiert sind darin die Module SpiH3 und SpiI2, sowie die KS- und AT-Domäne des darauffolgenden Moduls (s. Abb. 17). Der Bereich, in dem die beiden Module codiert sind wurde 2a und 2b genannt, da hier die Identität rund 98% zueinander beträgt (s. Tab. 19 und Anhang 3). Dieser Bereich erscheint im Modul SpiJ2 ein weiteres mal (2c). Mit dem Auffinden solch großer Sequenzwiederholungen stellt sich die Frage, ob es sich hier um ein deutliches Beispiel von evolutionären Schritten bei der Entwicklung von Polyketidsynthesegenclustern und damit Sekundärstoffen handelt.

Es wurde schon vermutet, dass genetisch bedingte Ereignisse im Genom von Mikroorganismen, wie Deletionen, Fusionen, Genduplikationen, Transpositionen oder horizontaler Gentransfer zur Entwicklung und der Diversität von Biosynthesen geführt haben könnten (Hopwood, 1997). Dies würde die Verbreitung von Polyketidsynthesegenen und ihrer strukturellen Ähnlichkeit, aber auch deren Variationen erklären. Duplikationen könnten dabei eine große Rolle spielen, was durch die nahe

Verwandtschaft von Domänen innerhalb eines Genclusters und verschiedener Gencluster im Organismus selbst zu erklären wäre. Häufig finden sich Sequenzwiederholungen aber nur auf kurzen DNA-Bereichen, die für einzelne Domänen innerhalb der Module codieren. Solche Beispiele werden bei Actinomyceten und Myxobakterien gefunden. Im Gencluster des Nystatins z. B. findet sich eine Sequenzwiederholung von etwa 700 bp in zwei KR-Domänen codierenden Bereichen von *nsyC*. Im Bereich des Epothilombiosynthesegenclusters (Molnar et al., 2000) lassen sich zwei Sequenzwiederholungen von 1200 und 1400 Nukleotiden finden, in denen die AT- Domäne von EpoC1/C2 und EpoD1/D2 codiert ist. Auch die AT- Domänen von MtaD und MtaF aus dem Myxothiazolbiosynthesegencluster (Silakowski et al., 1999) sind auf Nukleotidebene fast identisch. Auch die Adenylierungsdomänen, die im Genlocus A2 in den beiden NRPS- Modulen gefunden werden, zeigen hohe Identität zueinander (s. 3.7.6). Im Gegensatz dazu findet sich in der bisher untersuchten DNA-Sequenz des Spirangienbiosynthesegenclusters ein ganzes Modul und die darauf folgenden KS- und AT-Domäne (2a und b), wobei die DNA-Sequenz der beiden Domänen abgesetzt von dem Bereich 1 ein weiteres mal zu finden ist (2c). So wie in Abb.35 dargestellt, könnte die Spirangiensynthese aus zwei Duplikationen hervorgegangen sein. Entsprechend der hier dargestellten Hypothese könnte es dabei einen Ahnen des heutigen Spirangienbiosynthesegenclusters gegeben haben. Diesem Gencluster würden drei Module gegenüber den hier behandelten acht Modulen fehlen (s. Abb. 35A). Aus dem Bereich 2b könnte durch eine erste Duplikation der Bereich 2c hervorgegangen sein (s. Abb. 35B). Das dafür notwendige Duplikations- und Rekombinationsereignis würde eine weitere, ähnliche Region voraussetzen, die ein funktionelles PKS-Modul enthält. Möglicherweise stammt dies aus einem anderen Genclusterbereich. Auch eine Duplikation eines größeren Bereiches, der im Verlauf der Evolution deutlich mehr Veränderungen unterworfen wäre, ist denkbar. Gerade KS und AT-Domänen sind aufgrund von Spezifität und Katalyse deutlich höher konserviert als andere Bereiche. Für diese erste Duplikation, bei der Bereich 2c entstanden ist, spricht die Tatsache, dass Region 2a und 2b eine deutlich höhere Übereinstimmung haben als Region 2c. Zudem besitzen die Bereiche 2b und 2c einige gemeinsame Nukleotide, die vermuten lassen, dass diese Bereiche auseinander hervorgegangen sind. In einem weiteren Duplikationsereignis könnte dann aus dem Bereich 1a die Region 1b

entstanden sein (s. Abb. 35C) und somit die heutige Sequenz des Spirangienbiosynthesegenclusters darstellen. Unterstützt wird diese These durch das Maß an Ähnlichkeit der Sequenzen zueinander (Li und Graur, 1991).

Gerade bei PKS des Typ I scheint eine solche Hypothese denkbar. Die Linearität des Modulaufbaus, die wie ein Produktionsband arbeitet, ist auch eine Voraussetzung für viele Experimente, die im Rahmen der Biokombinatorik durchgeführt werden. Mit dem wachsenden Verständnis der Biomachineserie wird mit Inaktivierungen, Substitutionen und Modulaustausch versucht, neue Moleküle zu generieren. Dies ist schon bei einigen Genclustern gelungen, wie bei der 6-Deoxyerythronolid B-Synthase, bei der die Deletion von Modulen zu neuen, kleineren Molekülen geführt hat (Ranganathan et al., 1999). Auch die Kombination von artfremden Modulen wie beim Rapamycin ist gelungen (Rowe et al., 2001).

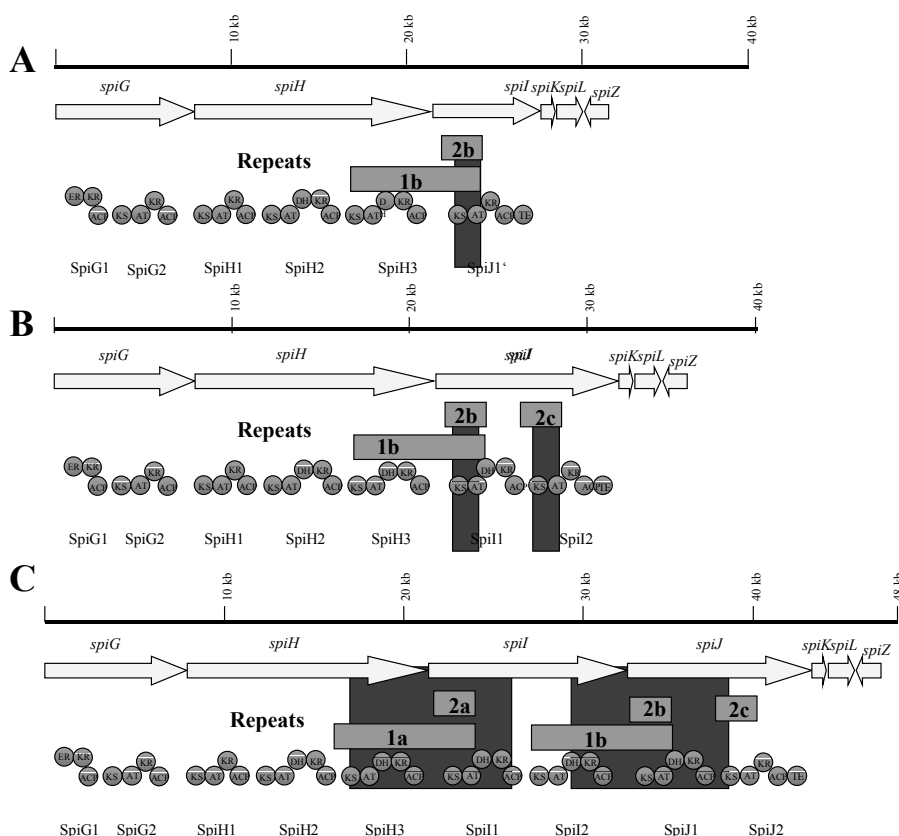


Abb. 35: Mögliche Evolution der Spirangienbiosynthese durch Genduplikation

Gezeigt sind entsprechend der Evolutionstheorie (s. Text) die Vorläufer-Polyketidsynthase A, nach der ersten Duplikation Polyketidsynthase B und nach der zweiten Duplikation die heutige Spirangienbiosynthese C. Gekennzeichnet sind die Bereiche der Duplikation 1a und 1b sowie 2a, 2b und 2c, sowie die darin codierten PKS- Module und Domänen.

Auch hier ist die Natur das eigentliche Vorbild für die große Vielfalt und Diversität an Molekülen und den für die Biosynthese notwendigen Genen. Hinweise auf horizontalen Gentransfer und Evolution gibt es auch zum Epothilombiosynthesegencluster, bei dem die Verwandtschaft von KS-Domänen im Gencluster und zu anderen bekannten KS-Domänen untersucht wurde (Lopez, 2003). Die Untersuchung zeigt, dass auf Aminosäure-Ebene auch Verwandtschaftsgrade erkennbar sind, die bei der Notwendigkeit der Funktionalität auch Ähnlichkeiten zu Domänen anderer Spezies zeigen. Duplikations- und Rekombinationsereignisse, wie sie für das Spirangienbiosynthesegencluster angenommen werden, scheinen dabei eine bedeutende Rolle zu spielen. Es wäre interessant, die DNA-Sequenz der Spirangiensynthese aus anderen *S. cellulosum*-Stämmen zu vergleichen. Möglicherweise finden sich so noch mehr Hinweise auf evolutive Aspekte. Es könnten aber auch Spirangiene isoliert werden, wie in Abb. 36 dargestellt, die aus den postulierten Vorläufern der Spiangiensynthese biosynthetisiert werden.

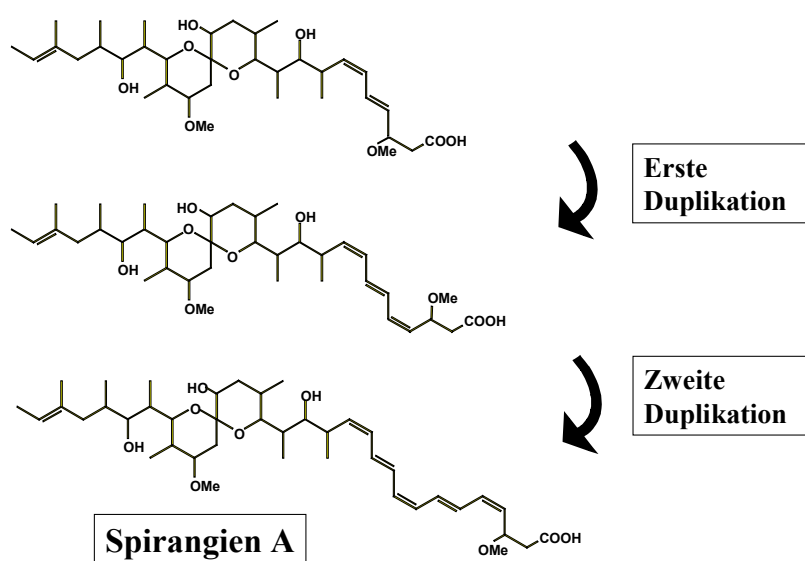


Abb. 36: Mögliche produzierte Spirangiene des durch Duplikation entstandenen Spirangienbiosynthesegenclusters.

Gezeigt sind entsprechend der Evolutionstheorie der Spirangiensynthese die biosynthetisierten Moleküle entsprechend Abb. 35 A, B und C.

EpoF konvertiert Epothilon C/D in Epothilon A/B

Obwohl im Verlauf dieser Arbeit das Epothilombiosynthesegencluster beschrieben wurde (Julien et al., 2000; Molnar et al., 2000), wurde versucht, die Funktionalität in *S. cellulosum* So ce90 nachzuweisen. Es wurde mit Veröffentlichung der Sequenz des Epothilombiosynthesegenclusters, eine Epoxidase/Monooxygenase vermutet, die mit EpoF (Molnar et al., 2000) bzw. EpoK (Julien et al., 2000) bezeichnet wurde. In einem Enzymassay konnte der vermutete Umsatz von Epothilon D zu Epothilon B auch gezeigt werden (Julien et al., 2000). Der *in vivo*-Nachweis gelang erst, als das Epothilombiosynthesegencluster heterolog in *M. xanthus* exprimiert wurde und dem inaktiven *epoK* in *M. xanthus* die Epothilone C und D als Komponenten isoliert werden konnten (Julien und Shah., 2002). In dieser Arbeit wurde der Genlocus über Hybridisierung und PCR-gestützte Experimente zugeordnet. Die produzierten Epothilone, die als Leitstruktur für künftige Chemotherapeutika dienen (s. 1.8), haben durchaus unterschiedliche biologische Aktivität. Gerade Epothilon D scheint der aktivste Kandidat unter den natürlichen Epothilonen zu sein (Frykman et al., 2002). Epothilon D wird von dem Produzenten *S. cellulosum* So ce90 aber nur als Nebenprodukt erhalten (Gerth et al., 1996). Der Unterschied von Epothilon C/D zu Epothilon A/B besteht in der Epoxidgruppe an Position 12/13 des Epothilongerüsts (s. Abb. 1). Mit der Inaktivierung des Gens *epoF* in *S. cellulosum* So ce90 sollte die Beteiligung im Produzenten nachgewiesen werden. Nach erfolgter Inaktivierung von *epoF* wurden die Mutanten *S. cellulosum* So ce90 JKB12 und JKB14 auf ihre Fähigkeit zur Produktion der Epothilone hin überprüft. Wie in Abb. 28 zu sehen ist, produzierten die Insertionsmutanten Epothilon C und D in einer dem Wildtyp vergleichbaren Menge an Epothilon A und B.. Damit konnte erneut der Nachweis gelingen, dass EpoF an der Umwandlung von Epothilon C/D zu A/B beteiligt ist, wie bereits durch die Untersuchung von Produktionskinetiken an verschiedenen Mutanten von *S. cellulosum* So ce90 beschrieben (Gerth et al., 2001). Was an dem Chromatogramm auffällt ist, dass trotz der Inaktivierung immer noch Spuren von Epothilon A und B gebildet werden. Die Vermutung, dass es sich um Klone handeln könnte, die nicht nur aus einer mutagenisierten Zelle entstanden sind, konnte durch erneutes kultivieren unter Selektion mit Hygromycin und anschließender Überprüfung durch PCR-Experimente nicht bestätigt werden. Scheinbar besitzt die Mutante, die aus dem Überproduzenten

S. cellulosum So ce90B2 hervorgegangen ist, immer noch eine Oxygenaseaktivität. Es ist nicht ganz klar, woher diese Aktivität stammt. Eine Vermutung ist eine partielle Aktivität des nach der Inaktivierung verbleibenden Genfragmentes, welches exprimiert werden könnte. Dies würde die Daten bestätigen, wonach eine größere Menge an Epothilon D zur Hemmung der Epoxidierung und damit zur geringeren Produktion an Epothilon A führt (Gerth et al., 2001), wie die Verhältnisse der entstandenen Produkte in Abb. 28 erkennen lassen. Andererseits bestätigten Untersuchungen, dass auch *S. cellulosum* So ce56, aus dem bisher keine Epothilone nachweisbar waren, in der Lage ist, eine Biotransformation von gefüttertem Epothilon C zu Epothilon A durchzuführen (Gerth, pers. Mitteilung). Es wäre damit möglich, dass eine andere Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase diese Reaktion unspezifisch katalysiert. Dies steht im Gegensatz zur Aussage vorheriger Untersuchungen, bei dem *S. cellulosum*-Stämme, die kein Epothilon produzieren, auch nicht zur Umwandlung von Epothilon C/D in Epothilon A/B fähig waren. Da bei der Mutante *S. cellulosum* So ce90 JKB14 aber nur geringe Mengen an Epothilon A und B gefunden wurden und eine unspezifische Katalyse sicherlich höhere Umsatzraten zeigen könnte, ist eine Teilaktivität am wahrscheinlichsten. Neueste Untersuchungen, die mit Hilfe einer Transposon-mutagenese durchgeführt wurden, sollen auch zur Inaktivierung von *epoK* im Produzentenstamm *S. cellulosum* So ce90 geführt haben (Julien und Fehd, 2003). Hier sind leider keine Angaben vorhanden, welches Produktspektrum an Epothilonen vorhanden ist, um zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse einen Vergleich ziehen zu können.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob *S. cellulorum* So ce90 das genetische Potential besitzt, um mehr als die beiden bekannten Sekundärmetabolite Epothilon und Spirangien zu produzieren und welche Gene an der Spirangienbiosynthese beteiligt sind.

- 106 rekombinante Cosmide aus einer Cosmidgenombibliothek von *S. cellulorum* So ce90, konnten mit Hilfe der PCR, Restriktionsanalyse und Southern Hybridisierungen zu mindestens 6 Gruppen zusammengefasst werden (A2, A5, Cos 6, Cos 8, A6-A7, A9). Es zeigten sich Hinweise auf zwei weitere Gruppen (A8, A10), die von den anderen Gruppen unabhängig zu sein scheinen. Der Produzent *S. cellulorum* So ce90 besitzt somit das genetische Potential für die Bildung von wahrscheinlich acht verschiedenen Sekundärstoffen des Typs Polyketid und/oder Polypeptid.
- Cosmide aus den Gruppen A2, A5, Cos 6, Cos 8, A7 und A6 wurden in unterschiedlicher Qualität sequenziert. Abgeleitete Aminosäuresequenzen von offenen Leserahmen der Cosmide A2 und A5 zeigten Ähnlichkeiten zu PKS, NRPS, möglichen Regulatoren und Proteinen, welche aus Eukaryonten bekannt sind. Dazu zählen eine Arachidonat-Lipoxygenase oder eine L-DOPA Decarboxylase. Cos 6 zeigt NRPS und PKS-homologe Gene auf einem 42 kb großen Abschnitt. In der Sequenz findet sich ein ORF mit Ähnlichkeit zur Zwittermicinresistenz aus *Bacillus cereus* und ein Abschnitt mit Ähnlichkeit zu einem IS-Element aus *E. coli*. Da der Leserahmen der Polyketidsynthesesequenz durch das IS-Element unterbrochen wird, wird das Gencluster als inaktiv angenommen. Die Sequenz die durch die Cos 8-Gruppe repräsentiert wird, enthält das Epothilonbiosynthesegencluster. Mit der Sequenzierung der Cosmide A6 und A7 konnten 62 kb an zusammenhängender DNA-Sequenz erhalten werden. Diese zeigen abgeleitete Proteine mit Ähnlichkeit zu bakteriellen Polyketidsynthasen, einer O-Methyltransferase und einer Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenase (*spiG-spiL*). Stromabwärts befindet sich ein Gen (*spiZ*), dessen Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu ECF-Sigmafaktoren zeigt und einen potentiellen Regulator darstellt.. Weitere Analysen der Teilsequenz des

Polyketidbiosynthesegenclusters zeigen ungewöhnlich große Bereiche von bis zu 8 kb an Sequenzwiederholungen. Diese Bereiche stellen ganze funktionelle Polyketidsynthesemodule oder Teile davon dar. Mit diesen Einheiten lässt sich ein Modell für eine mögliche Evolution des distalen Bereiches der Polyketidsynthese aufstellen.

- Für die Konjugation wurde eine Resistenzkassette gegen Hygromycin B konstruiert und die Funktion in *E. coli* und *S. aurantiaca* DW 4/SB1 getestet. Für die Inaktivierungsexperimente mittels triparentaler Konjugation wurde der mobilisierbare Vektor pSUPHyg auf Basis des Vektors RP4 konstruiert.
- Mit Hilfe der Insertionsmutagenese im Bereich des Gens *spiH* aus dem Genclusterbereich A7 konnte der distale Teil der Spirangiensynthese identifiziert werden, welcher einer Polyketidsynthese des Typ I entspricht.
- Eine Inaktivierung des mit *spiL* bezeichneten Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenase-Gen zeigt, dass das Enzym an der Hydroxylierung an Position 20 im Spirangienmolekül verantwortlich ist. Eine zusätzliche Funktion bei der Spiroketalbildung kann hier postuliert werden. Darüber hinaus konnte ein glykosyliertes Spirangien isoliert werden, das bisher nicht aus dem Produzenten *S. cellulosum* So ce90 beschrieben war.
- Eine Insertionsmutagenese im Gen *spiZ*, welches als abgeleitetes Protein Ähnlichkeit zu Regulatoren aus der ECF-Sigma-Faktoren-Familie zeigt, stellt SpiZ in direkten Zusammenhang der Regulation der Spirangienbiosynthese.
- Die Funktionalität von *epoF*, welches als Expressionsprodukt an der Epoxidierung der Epothilone C/D beteiligt ist, konnte mit Hilfe einer weiteren Insertionsmutagenese in diesem Genbereich gezeigt werden.

5 Literatur

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Andersen, J. F., und Hutchinson, C. R.** (1992) Characterization of *Saccharopolyspora erythraea* cytochrome P-450 genes and enzymes, including 6-deoxyerythronolide B hydroxylase. *J. Bacteriol.*, **174**, 725-735.
- Anke, T., Oberwinkler, F., und Steglich, W.** (1977) The strobilurins- new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. Ex Fr.) Sing. *J. Antibiotics*, **30**, 806-810.
- Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Staunton, J., Leadlay, P. F.** (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, **169**, 9-16.
- Arai, T., Takahashi, K. und Kubo, A.** (1977) New antibiotics, saframycins A, B, C, D and E. *J. Antibiot.*, **30**, 1015-1018.
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A. und Tamura, C.** (1964) Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 575-576.
- Arslanian, R. L., Tang, L., Blough, S., Ma, W., Qiu, R. G., Katz, L. und Carney, J. R.** (2002) A new cytotoxic epothilone from modified polyketide synthases heterologously expressed in *Myxococcus xanthus*. *J. Nat. Prod.*, **65**, 1061-1064.
- Asai, K., Yamaguchi, H., Kang, C.-M., Yoshida, K.-I., Fujita, Y., Sadaie, Y.** (2003) DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* sigma factors of extracytoplasmic function family. *FEMS Microbiol. Lett.*, **220**, 155-160.

- August, P. R., Tang, I., Yoon, Y. J., Ning, S., Müller, R., Yu, T. W., Talor, M., Hoffmann, D., Kim, C. G., Zhang, X., Hutchinson, C. R., Floss, H. G.** (1998) Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.*, **5**, 69-79.
- Balog, A., Meng, D., Kamenecka, T., Bertinato, P., Su, D.-S., Sorensen, E. J. und Danishefsky, S. J.** (1996) Totalsynthese von (-)-Epothilon A. *Angew. Chemie, Deutsche Ausg.*, **108**, 2976-2978.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M. und Sonnhammer, E. L.** (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 276-280.
- Beebe, J. M.** (1941) Studies on the myxobacteria. 2. The role of myxobacteria as bacterial parasites. *Iowa State College J. Sci.*, **15**, 319-337.
- Bennett, P. M., Grinsted, J., Richmond, M. H.** (1977) Transposition of TnA does not generate deletions. *Molec. Gen. Genet.*, **154**, 205-211.
- Bennett, J. W., Bhatnagar, D., und Chang, P. K.** (1994) The molecular genetics of aflatoxin biosynthesis. In: *The genus Aspergillus*, Powell, K. A., Renwick, A. and Peberdy J. F. (eds.), Plenum Press, New York, 51-58.
- Bevitt, D. J., Cortes, J., Haydock, S. F., Leadlay, P. F.** (1992) 6-deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 39-49.
- Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B. und Müller, R.** (1999) Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the Stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim. Biophys. Acta*, **1445**, 185-195.
- Bisang, C., et al., and Leadlay, P. F.** (1999) A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature*, **401**, 502-505.

- Blondelet-Rouault, M.-H., Weiser, J., Lebrihi, A., Branny, P., Pernodet, J.-L.** (1997) Antibiotic resistance gene cassettes derived from the Omega interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*. *Gene*, **190**, 315-317.
- Boddy, C. N., Schneider, T. L., Hotta, K., Walsh, C. T. und Khosla C.** (2003) Epothilone C macrocyclisation and hydrolysis are catalyzed by the isolated thioesterase domain of epothilone polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3428-3429.
- Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, M.** (1995) Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with Taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.*, **55**, 2325-2333.
- Bonfield, J., Smith, K. und Staden, R.** (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4992-4999.
- Botella, J. A., Murillo, F. J., und Ruiz-Vazquez, R. M.** (1995) A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur. J. Biochem.* **223**, 238-248.
- Breton, A. M., Jaoua, S. und Guespin-Michel, J.** (1985) Transfer of plasmid RP4 to *Myxococcus xanthus* and evidence for its integration into the chromosome. *J. Bacteriol.*, **161**, 523-528.
- Browning, D. F., Whitworth, D. E. und Hodgson, D. A.** (2003) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Mol. Microbiol.*, **48**, 237-251.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987) X11-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-379.
- Burnham, J. C., Collart, S. A. und Highison, B. W.** (1981) Entrapment and lysis of the cyanobacterium *Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* Pco2. *Arch. Microbiol.*, **129**, 285-294.

- Burnham, J. C., Collart, S. A. und Daft, M. J.** (1984) Myxococcal predation of the cyanobacterium *Phormidium luridum* in aqueous environments. Arch. Microbiol., **137**, 220-225.
- Cane, D. E.** (1997) Polyketide and nonribosomal polipeptide biosynthesis. Chem. Rev., **97**, 2463-2706.
- Cane, D. E., Walsh, C. T., Khosla, C.** (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutaions, and mutaions. Science, **282**, 63-68.
- Cane, D. und Walsh, C.** (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, Chem. Biol., **6**, 319-325.
- Challis, G., Ravel, J. und Townsend, C.** (2000) Predictive, structure-based model of amino-acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. Chem. Biol., **7**, 211-224.
- Chen, H.-W., Keseler, I. M., and Shimkets, L. J.** (1990) The genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel elektrophoresis. J. Bacteriol., **172**, 4206-4213.
- Chen, H., O'Connor, S., Cane, D. E., Walsh, C. T.** (2001) Epothilone biosynthesis: assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit on the EpoB subunit. Chem. Biol., **8**, 899-912.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T. und Dittmann, E.** (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation. J. Bacteriol., **185**, 564-572.
- Corbell, N. und Loper, J. E.** (1995) A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* PF-5. J. Bacteriol., **177**, 6230-6.
- Cortes, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J. und Leadlay, P. F.** (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythrea*. Nature, **348**, 176-178.
- De Lorenzo, V. und Timmis, K. N.** (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10 derived minitransposons. Meth. Enzymol., **135**, 386-405

- Döhren von, H., Keller, U., Vater, J., und Zocher, R.** (1997) Multifunctional peptide synthetases. Chem. Rev., **97**, 2675-
- Dombroski, A. J.** (1997) Recognition of the –10 promotor sequence by a partial polypeptide of sigma 70 *in vitro*. J. Mol. Biol., **7**, 3487-3494.
- Donadio, S., Straver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J. und Katz, L.** (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. Science, **252**, 675-679.
- Donadio, S. und Katz, L.** (1992) Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythrea*. Gene, **111**, 51-60.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M. T., Edwards, D. und Shen, B.** (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces vertisillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. Chem. Biol., **7**, 623-642.
- Du, L. und Shen, B.** (2001) Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. Curr. Opin. Drug Disc., **4**, 215-228.
- Dworkin, M.** (2000) Introduction to the myxobacteria, in: Prokaryotic Development, Brun, Y. V. and Shimkets, L. J. (eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, 221-242.
- Emmert, E. A. B., Klimowicz, A. K., Thomas, M. G., and Handelsman, J.** (2004) Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. Appl. And Environ. Microbiol., **70**, 104-113.
- Fleming, A.** (1929) On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. J. Exp. Pathol., **10**, 226-36.
- Flett, F., Mersinias, V. und Smith, C. P.** (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Echerichia coli* to methyl DNA-restricting *streptomyces*. FEMS Microbiol. Lett., **155**, 223-9.

- Frykman, S., Tsuruta, H., Lau, J., Regentin, R., Ou, S., Reeves, C., Carney, D., Santi, D. und Licari, P.** (2002) Modulation of epothilone analog production through media design. *J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.*, **28**, 17-20.
- Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Horinouchi, S.** (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, **400**, 897-899.
- Gaitatzis, N., Hans, A., Müller, M. und Beyer, S.** (2001a) The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J. Biochem.*, **129**, 119-124.
- Gaitatzis, N., Kunze, B. und Müller, R.** (2001b) In vitro reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg al5: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11136-11141.
- Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G. und Müller, R.** (2002) The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 13082-13090.
- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. und Trowitzsch, W.** (1980) Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (*myxobacterales*). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, **33**, 1474-1479.
- Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Höfle, G., Irschik, H. und Reichenbach, H.** (1982) Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). *J. Antibiot.*, **35**, 1101-1103.
- Gerth, K., Thierbach, G. und Reichenbach, H.** (1983) The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (*myxobacterales*). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J. Antibiot.*, **36**, 1150-1156.

- Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (1994) The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria). I. Soraphen A: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.*, **47**, 23-31.
- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H. und Reichenbach, H.** (1996) Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **49**, 560-563.
- Gerth, K., Steinmetz, H., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (2000) Studies on the biosynthesis of epothilones: The biosynthetic origin of the carbon skeleton. *J. Antibiot.*, **53**, 1373-1377.
- Gerth, K., Steinmetz, H., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (2001) Studies on the biosynthesis of epothilones: The PKS and the epothilone C/D monooxygenase. *J. Antibiot.*, **54**, 144-148.
- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S., Müller, R.** (2003) Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotechnol.* **106**, 233-253.
- Glomp, I., Saulnier, P., Guespin-Michel, J. und Schairer, H. U.** (1988) Transfer of incP plasmids into *Stigmatella aurantica* leading to insertional mutants affected in spore development. *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 213-217.
- Gorham, H. C., McGowan, S. J., Robson, P. R. H. und Hodgson, D. A.** (1996) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol. Microbiol.*, **19**, 171-186.
- Hammer, P. E., Hill, D. S., Lam, S. T., Van Pee, K.-H. und Ligon, J. M.** (1997) Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2147-2154.
- Hanahan, D.** (19983) Studies on transformation of *Echerischia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.

- Hardt, I. H., Steinmetz, H., Gerth, K., Sasse, F., Reichenbach, H. und Höfle, G.** (2001) New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, Strains So ce90/B2 and So ce90/D13: Isolation, structure elucidation and SAR studies. *J. Nat. Prod.*, **64**, 847-856.
- Haydock, S. F., Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., Khaw, L. E., König, A., Marsden, A. F., Galloway, I. S., Staunton, J., Leadlay, P. F.** (1995) Divergent sequence motives correlated with the substrate specificity of (methyl-) malonyl-CoA acyl carrier protein transacylase domain in modular polyketide synthases. *FEBS Microbiol. Lett.*, **374**, 246-248.
- Helmann, J. D.** (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances Microbial Phys.*, **46**, 47-110.
- Hodgson, D. A. und Murillo, F. J.** (1993a) Genetics of regulation and pathway of synthesis of carotenoids. In *Myxobacteria II*, Dworkin, M. and Kaiser, D. (eds). Washington DC: American Society for Microbiology Press, 157-181.
- Hodgson, D. A.** (1993b) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: genetic analysis of the *carR* region. *Mol. Microbiol.*, **7**, 471-488.
- Höfle, G., Kunze, B., Zorzin, C. und Reichenbach, H.** (1984) Stigmatellin A und B-zwei neue Antibiotika aus *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1984, 1883-1904.
- Höfle, G., Bedorf, N., Gerth, K. and Reichenbach, H.** (1995), Patentschrift DE 4211056 C1. Herstellungsverfahren der Spirangiene; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Germany.
- Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K., Reichenbach, H.** (1996) Epothilone A and B-novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: isolation, crystal structure, and conformation in solution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 1567-1569.
- Hopwood, D. A.** (1997) Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem. Rev.*, **97**, 2465-2497.

- Horsburgh, M. J. und Moir, A.** (1999) SM, an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.*, **32**, 41-50.
- Huang, X., Gaballa, A., Cao, M. und Helmann, J. D.** (1999) Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function σ factor, SW. *Mol. Microbiol.*, **31**, 361-371.
- Hughes, K. T. und Mathee, K.** (1998) The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 231-286.
- Ikeda, H. und Omura, S.** (1997) Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.*, **97**, 2591-2609.
- Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Otha, T. und Omura, S.** (1999) Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9509-9514.
- Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (1987) The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.*, **40**, 7-13.
- Irschik, H., Trowitzsch-Kienast, W., Gerth, K., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (1988) Saframycin Mx1, a new natural saframycin isolated from a myxobacterium. *J. Antibiot.*, **41**, 993-998.
- Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G., Reichenbach, H.** (1995) Sorangiolid A, a new antibiotic isolated from the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce12. *J. Antibiot.*, **48**, 886-887.
- Ishikawa, J. und Hotta, K.** (1999) FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol. Lett.*, **174**, 251-253.
- Jaoua, S., Neff, S. und Schupp, T.** (1992) Transfer of mobilizable plasmids to *Sorangium cellulosum* and evidence for their integration into the chromosome. *Plasmid*, **28**, 157-165.

- Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L. und Khosla, C.** (2000) Isolation and characterisation of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *Gene*, **249**, 153-160.
- Julien, B. und Shah, S.** (2002) Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*. *Anti. Agents Chemoter.*, **46**, 2772-2778.
- Julien, B. und Fehd, R.** (2003) Development of a *mariner*-based transposon for use in *Sorangium cellulosum*. *Appl. And Environm. Microbiol.*, **69**, 6299-6301.
- Kagan, R. M. und Clarke, S.** (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, 417-27.
- Keating, T. A. und Walsh, C. T.** (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 598-606.
- König, A., Schwecke, T., Molnar, I., Bohm, G. A., Lowden, P. A., Staunton, J., Leadlay, P. F.** (1997) The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin-nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of *rapP* from *Streptomyces hygroscopicus*. *Eur. J. Biochem.*, **247**: 526-534.
- Kojima, I. Kasuga, K., Kobayashi, M., Fukasawa, A., Mizuno, S., Arisawa, a. und Akagawa, H.** (2002) The *rpoZ* gene, encoding the RNA-polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. *J. Bacteriol.*, **184**, 6417-6423.
- Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. und Marahiel, M. A.** (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **4**, 927-937.
- Konz, D. und Marahiel, M. A.** (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity?. *Chem. Biol.*, **6**, 39-48.

- Kopp, M., Irschik, H., Gross, F., Perlova, O., Sandmann, A., Gerth, K., Müller, R.** (2004) Critical variations of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strains So ce12 and So ce56: development of a mariner-based transposon mutagenesis system. *J. Biotechnology*, **107**, 29-40.
- Kunze, B., Kemmer, T., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (1984) Stigmatelin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (*Myxobacterales*). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, **37**, 454-461.
- Kunze, B., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (1987) The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, **40**, 258-265.
- Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Höfle, G. und Reichenbach, H.** (1989) Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (*Myxobacterales*). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, **42**, 14-17.
- Leadlay, P. F., Staunton, J., Oliynyk, M., Bisang, C., Cortes, J., Frost, E., Hughes-Thomas, Z. A., Jones, M. A., Kendrew, S. G., Lester, J. B., Long, P. F., McArthur, H. A. I., McCormick, E. L., Oliynyk, Z., Stark, C. B. W. und Wilkinson, C. J.** (2001) Engineering of complex polyketide biosynthesis-insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 360-367.
- Li, W.-H. und Graur, D.** (1991) Fundamentals of molecular evolution., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Li, S.-M., Westrich, L., Schnidt, J., Kuhnt, C. und Heide, L.** (2002) Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: new coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology*, **148**, 3317-3326.
- Ligon, J., Hill, S., Beck, J., Zirkle, R., Molnar, I., Zawodny, J., Money, S., Schupp, T.** (2002) Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26. *Gene*, **285**, 257-267.

- Liou, G. F., Lau, J., Cane, D. E. und Khosla, C.** (2003) Quantitative analysis of loading and extender acyltransferases of modular polyketide synthases. *Biochemistry*, **42**, 200-207.
- Lonetto, M., Gribskov, M. und Gross, C. A.** (1992) The sigma70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriology*, **174**, 3843-3849.
- Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E., und Buttner, M. J.** (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma-factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7573-7577.
- Lopez, J. V.** (2003) Naturally mosaic operons for secondary metabolite biosynthesis: variability and putative horizontal transfer of discrete catalytic domains of the epothilone polyketide synthase locus. *Mol. Gen. Genomics*, **270**, 420-431.
- Lozano, M. J. F., Remsing, L. L., Quiros, L. M., Brana, A. F., Fernandez, E., Sanchez, C., Mendez, C., Rohr, J. und Salas, J. A.** (2000) Characterization of two polyketide methyltransferases involved in the biosynthesis of the antitumor drug Mithramycin by *Streptomyces argillaceus*. *J. B. C.*, **275**, 3065-3074.
- Mahmud, T., Bode, H. B., Silakowski, B., Kroppenstedt, R. M., Xu, M., Nordhoff, S., Höfle, G., und Müller, R.** (2002) A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J. B. C.*, **277**, 32768-32774.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kimura, S., Nakata, A., und Ishihama, A.** (1988) Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*-Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **203**, 85-95.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., und Nakata, A.** (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.*, **210**, 551-559.

- Malpartida, F., und Hopwood, D. A.** (1984) Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature*, **309**, 462-464.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., und Mootz, H.** (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.*, **97**, 2651-2674.
- Martinez-Argudo, I., Ruiz-Vasquez, R. M. und Murillo, F. J.** (1998) The structure of an ECF-S-dependent, light-inducible promotor from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.*, **30**, 883-893.
- Martinez-Bueno, M. A., Tobes, R. Rey, M. und Ramos, J.-L.** (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ. Microbiology*, **4**, 842-855.
- Miller, J. H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Miller, D. A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T. A., Walsh, C. T.** (2002) Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.*, **9**, 333-444.
- Missiakas, D. und Raina, S.** (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.*, **28**, 1059-1066.
- Mittenhuber, G.** (2002) An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 77-91.
- Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D., Gorlach, J., Mayo, J., Hu, A., Goff, S., Schnid, J. und Ligon, J.** (2000) The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem. Biol.*, **7**, 97-109.

- Moore, B. S. und Hertweck, C.** (2002) Biosynthesis and attachmant of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.*, **19**, 70-99.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D. und Marahiel, M. A.** (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chem. BioChem.*, **3**, 490-504.
- Moraleda-Munoz, A., Carcerro-Lerida, J., Perez, J., und Munoz-Dorado, J.** (2003) Role of two novel two-component regulatory systems in development and phosphatase expression in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **185**, 1376-1383.
- Mühlradt, P. F. und Sasse, F.** (1997) Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity. *Cancer Res.*, **57**, 3344-3346.
- Müller, R., Gerth, K., Brandt, P., Blöcker, H. und Beyer, S.** (2000) Identification of an L-dopa decarboxylase gene from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Arch. Microbiol.*, **173**, 303-306.
- Neumann, B., Pospiech, A. und Schairer, H. U.** (1992a) Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Trends Genet.*, **8**, 332-333.
- Neumann, B., Pospiech, A. und Schairer, H. U.** (1992b) Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J. Bacteriol.*, **174**, 6307-6310.
- Neumann, B., Pospiech, A., Schairer, H. U.** (1993) A physical and genetic map of the *Stigmatella aurantiaca* DW 4/3-1 chromosome. *Mol. Microbiol.* **10**, 1087-1099.
- Nicolaou, K., Roschangar, F., Vourloumis, D.** (1998) Chemie und Biologie der Epothilone. *Angew. Chem.*, **110**, 2120-2153.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K.-I., und Shirai, M.** (1999) Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis spp.* *J. Biochem.*, **126**, 520-529.

- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakai, Y., Hattori, M.** (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci (USA), **98**, 12215-12220.
- Oubrie, A. und Dijkstra, B. W.** (2000) Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymatic reactions. Protein Sci., **9**, 1265-1273.
- Paitan, Y., Alon, G., Orr, E., Ron, E. Z., Rosenberg, E.** (1999) The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. J. Mol. Biol., **286**, 465-474.
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J.** (1988) Improved tools for biological sequence analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 2444-2448.
- Perna, N. T., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamouisis, K. D., Apodaca, J., Anatharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A., Blattner, F. R.** (2001) genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature, **409**, 529-33.
- Pfeifer, B. A. und Khosla, C.** (2001) Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. Microbiol. Molecular Biol. Rev., **65**, 106-118.
- Pospiech, A., Cluzel, B., Bietenhader, J. und Schupp, T.** (1995) A new *Myxococcus xanthus* gene cluster for the biosynthesis of the antibiotic saframycin Mx1 encoding a peptide synthetase. Microbiology, **141**, 1793-1803.
- Pospiech, A., Bietenhader, J. und Schupp, T.** (1996) Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumor agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. Microbiology, **142**, 741-746.

- Pradella, S., Hans, A., Spröer, C., Reichenbach, H., Gerth, K. and Beyer, S.** (2002) Characterisation, genome size and genetic manipulation of *Sorangium cellulosum* So ce56. *Archiv. Microbiol.*, **178**, 484-492.
- Prentki, P. and Krisch, H. M.** (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, **29**, 303-313.
- Qualls, G. T., Stephens, K., White, D.** (1978) Morphogenetic movements and multicellular development in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Dev. Biol.*, **66**, 270-274.
- Ranganathan, A., Timoney, M., Bycroft, M., Cortes, J., Thomas, I. P., Wilkinson, B., Kellenberger, L., Hanefeld, U., Galloway, I. S., Staunton, J. and Leadlay, P. F.** (1999) Knowledge-based design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: a route to simple statin analogues. *Chem. Biol.*, **6**, 731-41.
- Raivio, T. L., Silhavy, T. J.** (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 591-624.
- Reichenbach, H.** (1984) Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes. In: E. Rosenberg (ed.), *Myxobacteria: Development and Cell interactions*. Springer Verlag, New York, N. Y., 1-50.
- Reichenbach, H., Gerth, K., Irschik, H., Kunze, B., and Höfle, G.** (1988) Myxobacteria: a new source of antibiotics. *Bio/Technology*, **6**, 115-121.
- Reichenbach, H. and Dworkin, M.** (1992) The myxobacteria. In: *The Prokaryotes*, 2nd edn. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. (eds). Springer Verlag, New York, N. Y., 3416-3487.
- Reichenbach, H.** (1993) Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy, in: Dworkin, M., Kaiser, D. (eds.), *Myxobacteria II*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 13-62.
- Reichenbach, H., Höfle, G., Böhlendorf, B. und Irschik, H.** (1994) Icumazole und Herstellungsverfahren. Patent DE 4305486.

- Reichenbach, H.** (1999) The ecology of the myxobacteria. *Env. Microb.*, **1**, 15-21.
- Reichenbach, H. und Höfle, G.** (1993) Production of bioactive secondary metabolites, in: Dworkin, M., Kaiser, D. (eds.), *Myxobacteria II*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 347-397.
- Reichenbach, H. und Höfle, G.** (1999) Myxobacteria as producers of secondary metabolites, in: Grabley, S., Thieriecke, R. (eds.), *Drug Discovery from Nature*, Springer Verlag, Berlin, 149-179.
- Rowe, C. J., Böhm, I. U., Thomas, I. P., Wilkinson, B., Rudd, B. A., Foster, G., Blackaby, A. P., Sidebottom, P. J., Roddis, Y., Buss, A. D., Staunton, J. and Leadlay, P. F.** (2001) Engineering a polyketide with a longer chain by insertion of an extra module into the erythromycin-producing polyketide synthase. *Chem. Biol.*, **8**, 475-485.
- Roy, R. S., Gehring, A. M., Milne, J. C., Belshaw, P. J. and Walsh, C. T.** (1999) Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat. Prod. Rep.*, **16**, 249-263.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santi, D. V., Siani, M. A., Julien, B., Kupfer, D., Roe, B.** (2000) An approach for obtaining perfect hybridization probes for unknown polyketide synthase genes: a search for the epothilone gene cluster. *Gene*, **247**, 97-102.
- Schinzer, D., Limberg, A., Bauer, A., Böhm, O. M. und Cordes, M.** (1997) Totalsynthese von (-)-Epothilone A. *Angew. Chemie, Deutsche Ausg.*, **109**, 545-546.
- Schneider, T. L., Walsh, C. T. and O'Connor, S. E.** (2002) Utilisation of alternate substrates by the first three modules of the epothilone synthase assembly line. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11272-11273.
- Schreier, M. H.** (1997) Mechanism of action of cyclosporin. In: T. Anke (ed.) *Fungal Biotechnology*. Chapman and Hall, Weinheim, 137-146.

- Schupp, T., Toupet, C., Cluzel, B., Neff, S., Hill, S., Beck, J. J. and Ligon, J. M.** (1995) A *Sorangium cellulosum* (Myxobacterium) gene cluster for the biosynthesis of the macrolide antibiotic Soraphen A: cloning, characterisation, and homology to polyketide synthase genes from Actinomycetes. *J. Bac.*, **177**, 3673-3679.
- Schwecke, T., and Leadlay, P. F.** (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7839-7843.
- Sha, S., Xue, Q., Tang, L., Carney, J. R., Betlach, M. and McDaniel, R.** (2000) Cloning, characterization and heterologous expression of a polyketide synthase and P-450 oxidase involved in the biosynthesis of the antibiotic oleandomycin. *J. Antibiot.*, **53**, 502-508.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Chen, M. T., Edwards, D. J.** (1999) Bleomycin biosynthesis in *Streptomyces verticillus* ATCC15003 : A model of hybrid peptide and polyketide biosynthesis, *Bioorg. Chem.*, **27**, 155-191.
- Shimkets, L. and Woese, C. R.** (1992) A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9459-9463.
- Shimkets, L. J.** (1993) The myxobacterial genome. In: Dworkin, M. and Kaiser, D. (eds.), *Myxobacteria* II. American Society of Microbiology, N. W. Washington, DC, pp. 85-108.
- Silakowski, B., Ehret, H., Schairer, H. U.** (1998) *fbfB*, a gene encoding a putative galactose oxidase, is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation. *J. Bacteriol.*, **180**, 1241-1247.
- Silakowski, B., Schairer, H. U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blöcker, H., Höfle, G., Beyer, S. and Müller, R.** (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from Myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37391-37399
- Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G. and Müller, R.** (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur. J. Biochem.*, **276**, 6476-6485.

- Silakowski, B., Nordsiek, G., Kunze, B., Blöcker, H. and Müller, R.** (2001a) Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: the myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Chem. Biol.*, **8**, 59-69
- Silakowski, B., Kunze, B., Müller, R.** (2001b) Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobakterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene*, **275**, 233-240.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A.** (1983) A broad host range mobilization system for in vitro genetic engeneering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/technology*, November, 784-790.
- Simon, R., O'Connell, M., Lables, M. and Pühler, A.** (1986) Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other Gram-negative bacteria. *Meth. Enzymol.*, **118**, 643-659.
- Singh, B. N.** (1947) Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 1-10.
- Sosio, M., Bossi, E., Bianchi, A., Donadio, S.** (2000) Multiple peptide synthetase gene clusters in Actinomycetes. *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 213-221.
- Spröer, C., Reichenbach, H. and Stackebrandt, E.** (1999) The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int. J. Sys. Bac.*, **49**, 1255-1262.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A.** (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **6**, 493-505.
- Stackebrandt, E., Murray, R. G. E. and Trüper, H. G.** (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **38**, 321-325.
- Staunton, J. and Weissman, K.** (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 380-416.

- Stites, T. E., Sih, T. R., Rucker, R. B.** (2000) Synthesis of [^{14}C]pyrroloquinoline quinone (PQQ) in *E. coli* using genes for PQQ synthesis from *K. pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1524, 247-252.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N.** (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183-215.
- Stohl, E. A., Milner, J. L., Handelsman, J.** (1999a) Zwittermicin A biosynthetic cluster. *Gene*, **237**, 403-411.
- Stohl, E. A., Brady, S. F., Clardy, J., Handelsman, J.** (1999b) ZmaR, a novel and widespread antibiotic resistance determinant that acetylates zwittermicin A. *J. Bacteriol.* **181**, 5455-5460.
- Sun, Y., Zhou, X., Liu, J., Bao, K., Zhang, G., Tu, G., Kieser, T. and Deng, Z.** (2002) *Streptomyces nanchangensis*, a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. *Microbiology*, **148**, 361-371.
- Tang, L., Yoon, Y., Choi, C. and Hutchinson, C.** (1998) Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene*, **216**, 255-265.
- Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. and Julien, B.** (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*, **28**, 640-642.
- Thaxter, R.** (1892) On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot. Gaz.*, **17**, 389-406.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T. and Neilan, A. B.** (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthase system. *Chem. Biol.*, **7**, 753-764.

- Tsai, H.-F., Wheeler, M. H., Chang, Y. C., and Kwon-Chung, K. J.** (1999) A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.* **181**, 6469-6477.
- Tsuji, S. Y., Cane, D. E. and Khosla, C.** (2001) Selective protein-protein interactions direct channelling of intermediates between polyketide synthase modules. *Biochemistry*, **40**, 2326-2331.
- Tuan, J. S., Weber, J. M., Staver, M. J., Leung, J. O., Donadio, S., Katz, L.** (1990) Cloning of genes involved in erythromycin biosynthesis from *Saccharopolyspora erythraea* using a novel *actinomycete-Escherichia coli* cosmid. *Gene*, **90**, 21-29.
- Umeyama, T., Lee, Horinouchi, P.-C.** (2002) Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 419-425.
- Walsh, C. T.** (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: Challenges and opportunities. *Chem. BioChem.*, **3**, 124-134.
- Ward, M. J., Lew, H., Treuner-Lange, A. and Zusman, D. R.** (1998) Regulation of motility behaviour in *Myxococcus xanthus* may require an extracytoplasmic-function sigma factor. *J. Bacteriol.*, **180**, 5668-5675.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben, W.** (2003) Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J. Biotechnology*, **106**, 221-232.
- Weinig, S., Mahmud, T., Müller, R.** (2003a) Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: a delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain. *Chem. Biol.*, **10**, 953-960.
- Weinig, W., Hecht, H.-J., Mahmud, T. und Müller, R.** (2003b) Melithiazol biosynthesis: Further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem. Biol.*, **10**, 939-952.

Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J. and Fox, G. E. (1985) A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**, 143-151.

Wösten, M. M. S. M. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, 127-150.

Wu, B., Hamdy, M. K. and Howe, H. B. (1968) Antimicrobial activity of a myxobacterium against blue-green algae. *Bacteriol. Proc.*, 48.

Yang, Z., He, Y., Vourloumis, D., Vallberg, H. und Nicolaou, K. C. (1997) Totalsynthese von Epothilon A. *Angew. Chemie, Deutsche Ausg.*, **109**, 170-172.

Yoon, Y. J., Kim, E.-S., Hwang, Y.-S., Choi, C.-Y. (2004) Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 626-634.

6 Anhang

Sequence 1: repeat2a 2368 bp

Sequence 2: Repeat2b 2383 bp

Sequence 3: repeat2c 2107 bp

Sequences (1:2) Aligned. Score: 98

Sequences (1:3) Aligned. Score: 97

Sequences (2:3) Aligned. Score: 98

```
repeat2a      GCGATCGAGCGGGCGGAGATCGACCCCGCGTCGCTCCAGGGCTCGCAGACCGGCGTCTTC 60
Repeat2b      GCGATCGAGCGGGCGGAGATCGACCCCGCGTCGCTCCAGGGCTCGCAGACCGGCGTCTTC 60
repeat2c      -----
```

```
repeat2a      GTCGGCGTCATGTACAACAACCTACGCGAGCCATCACCTTGCGGCGGACGGCGACGCGTCG 120
Repeat2b      GTCGGCGTCATGTACAACAACCTACGCGAGCGCCTCTTCGAGCCCGACGCGGACGTCGAG 120
repeat2c      -----
```

```
repeat2a      GGGTACGTGAGCTTCGCGAGCTCCGCGAGCGTCGCGTCGGGCAGGATCGCGTACACCTTC 180
Repeat2b      GGGTACGCGAGCTTCGCGAGCTCCGCGAGCGTCGCGTCGGGCAGGATCGCGTACACCTTC 180
repeat2c      -----
```

```
repeat2a      GGCTTCCACGGGCCCCACGGTCACCGTGGACACGGCGTGCAGCTCGTCGCTCGTCGCCGTT 240
Repeat2b      GGCTTCCACGGGCCCCACGGTCACCGTGGACACGGCGTGCAGCTCGTCGCTCGTCGCCGTT 240
repeat2c      -----
```

```
repeat2a      CATCTCGCGTGCCAGGCGTTACGAAGCGGCGAGTGCGCCCTCGCCCTCGCCGGCGGCGTC 300
Repeat2b      CATCTCGCGTGCCAGGCGTTGCGAAGCGGCGAGTGCGCCCTCGCCCTCGCCGGCGGCGTC 300
repeat2c      -----GAGTGCGCCCTCGCCCTCGCCGGCGGCGTC 30
               *****

repeat2a      ACCGTCATGGCCACGCGCGAGGCGTTCGACGCGCTGTCCTTC-----GCCGGCTCTCCC 354
Repeat2b      ACCGTCATGGCCACGCGCGAGGCGTTCGACGCGCTGTCCTTC-----GCCGGCTCTCCC 354
repeat2c      ACGGTGATGGCGTCGCGCGGCGCGTTCGACGGGCTCGCCTTCCTGGGAGCGGGAGCGCCG 90
               ** ** ***** ***** ***** ** ***** ** ** * **

repeat2a      GACGGCCGCTGCAAGTCGTTCTCCGCCGACGCCAACGGCGCCGGCTGGTCGGAAGGCGCG 414
Repeat2b      GACGGCCGCTGCAAGTCGTTCTCCGCCGACGCCAACGGCGCCGGCTGGTCGGAAGGCGCG 414
repeat2c      GACGGCCGCTGCAAGTCGTTCTCCGCCGACGCCAACGGCGCCGGCTGGTCGGAAGGCGCG 150
               *****

repeat2a      GGCATGGTCCTGCTCGAGCGCCTGTCCGACGCGCAGCGCAACGGCCACCCGATCCTCGCC 474
Repeat2b      GGCATGGTCCTGCTCGAGCGCCTGTCCGACGCGCAGCGCAACGGCCACCCGATCCTCGCC 474
repeat2c      GGCATGGTCCTGCTCGAGCGCCTGTCCGACGCGCAGCGCAACGGCCACCCGATCCTCGCC 210
               *****

repeat2a      GTCATCCGCGGCTCGGCGGTCAACCAGGACGGCAAGAGCCAGGGCCTCACC GCGCCCAAC 534
Repeat2b      GTCATCCGCGGCTCGGCGGTCAACCAGGACGGCAAGAGCCAGGGCCTCACC GCGCCCAAC 534
repeat2c      GTCATCCGCGGCTCGGCGGTCAACCAGGACGGCAAGAGCCAGGGCCTCACC GCGCCCAAC 270
               *****

repeat2a      GGGCCCGCGCAGGAGCGGGTCATCCGCCAGGCGCTCGCCGCGCGCGCCTGGAGACGCAC 594
Repeat2b      GGGCCCGCGCAGGAGCGGGTCATTGCCAGGCGCTCGCCGCGGCGCGCCTGGAGACGCAC 594
repeat2c      GGGCCCGCGCAGGAGCGGGTCATCCGCCAGGCGCTCGCCGCGCGCGCCTGGAGACGCAC 330
               ***** ***** *****

repeat2a      GACATCGACGCCGTCGAAGCCCACGGCACCGGCACGCCCCTCGGCGATCCGATCGAGGCG 654
Repeat2b      GACATCGACGCCGTCGAAGCCCACGGCACCGGCACGCCCCTCGGCGATCCGATCGAAGCG 654
repeat2c      GACATCGACGCCGTCGAAGCCCACGGCACCGGCACGCCCCTCGGCGATCCGATCGAGGCG 390
               ***** *****
```

```
repeat2a    AACGCGCTGCTGGCCACCTACGGGCTCGGCCGCCCTGCCGAGCGACCGCTGTGGCTCGGC 714
Repeat2b    AACGCGCTGCTGGCCACCTACGGGCTCGGCCGCCCTGCCGAGCGACCGCTGTGGCTCGGC 714
repeat2c    AACGCGCTGCTGGCCACCTACGGGCTCGGCCGCCCTGCCGAGCGACCGCTGTGGCTCGGC 450
            *****

repeat2a    AGCCTCAAGTCCAACGTCGGGCACACGCAGGCCGCCGCGGGCGTCGGCGGGATCATCAAG 774
Repeat2b    AGCCTCAAGTCCAACGTCGGGCACACGCAGGCCGCCGCGGGCGTCGGCGGGATCATCAAG 774
repeat2c    AGCCTCAAGTCCAACGTCGGGCACACGCAGGCCGCCGCGGGCGTCGGCGGGATCATCAAG 510
            *****

repeat2a    ACCGTCCTCGCCCTGCGAAACGGGCTGCTGCCCAGGACGCTGCACGCCACGCTCCGTCG 834
Repeat2b    ACCGTCCTCGCCCTGCGAAACGGGCTGCTGCCCAGGACGCTGCACGCCACGCTCCGTCG 834
repeat2c    ACCGTCCTCGCCCTGCGAAACGGGCTGCTGCCCAGGACGCTGCACGCCACGCTCCGTCG 570
            *****

repeat2a    CCCACGTCGATTGGGCCGCGGGCGGCCTGCGGCTGCTCGCGGACGCGGTTCCATGGACG 894
Repeat2b    CCCACGTCGATTGGGCCGCGGGCGGCCTGCGGCTGCTCGCGGACGCGGTTCCATGGACG 894
repeat2c    CCCACGTCGATTGGGCCGCGGGCGGCCTGCGGCTGCTCGCGGACGCGGTTCCATGGACG 630
            *****

repeat2a    AGGAACGGGCGGGTGCGCCGCGCGGCGGTCTCGTCGTTTCGGCCTGTCCGGCACCAACGCG 954
Repeat2b    AGGAACGGACGTGTGCGCCGCGCGGCGGTCTCGTCGTTTCGGCCTGTCCGGCACCAACGCG 954
repeat2c    AGGAACGGGCGGGTGCGCCGCGCGGCGGTCTCGTCGTTTCGGCCTGTCCGGCACCAACGCG 690
            *****  ** *****

repeat2a    CACGTGATCGTCGAAGAGGCGCCGCGCCCCGACCGGGACGAGGCGAGCCCGGCGCCGAGC 1014
Repeat2b    CACGTGATCGTCGAAGAGGCGCCGCGCCCCGACCGGGACGAGGCGAGCCCGGCGCCGAGC 1014
repeat2c    CACGTGATCGTCGAAGAGGCGCCGCGCCCCGACCGGGACGAGGCGAGCCCGGCGCCGAGC 750
            *****

repeat2a    GGGCGCGACCAGGCGCTGCCGGTGCTCCTGTCCGCGAAGACCGAGGACGCGCTGCGCGCG 1074
Repeat2b    GGGCGCGACCAGGCGCTGCCGGTGCTCCTGTCCGCGAAGACCGAGGACGCGCTGCGCGCG 1074
repeat2c    GGGCGCGACCAGGCGCTGCCGGTGCTCCTGTCCGCGAAGACCGAGGACGCGCTGCGCGCG 810
            *****
```



```
repeat2a      CAGGCCGCTCGCCTGCACGCCACCTCGCCGGCGACCCGGGCGCCTCGCTGGTCGACGTG 1134
Repeat2b      CAGGCCGCTCGCCTGCACGCCACCTCGCCGGCGACCCGGGCGTCTCGCTGGTTGACGTG 1134
repeat2c      CAGGCCGCTCGCCTGCACGCCACCTCGCCGGCGACCCGGGCGCCTCGCTGGTCGACGTG 870
               *****

repeat2a      GCCGCCTCGCTCGCCACCACGCGTGCCCACTTCGACCACCGCGCCGCCTTCGTGGCGCGC 1194
Repeat2b      GCCGCCTCGCTCGCCACCACGCGTGCCCACTTCGACCACCGCGCCGCCTTCGTGGCGCGC 1194
repeat2c      GCCGCCTCGCTCGCCACCACGCGTGCCCACTTCGACCACCGCGCCGCCTTCGTGGCGCGC 930
               *****

repeat2a      AGCCGCGACGCCCTGCTGGCCGCCCTCGACGCCCTTCGCGCGCGGCGCGATCGACGCGCCG 1254
Repeat2b      AGCCGCGACGCCCTGCTGGCCGCCCTCGACGCCCTTCGCGCGCGGCGCGATCGACGCGCCG 1254
repeat2c      AGCCGCGACGCCCTGCTGGCCGCCCTCGACGCCCTTCGCGCGCGGCGCGATCGACGCGCCG 990
               *****

repeat2a      GCCTCGGTGCGCTCGGTGCGCGGAGAGCCCCACCAAGCTGGCCTTGCTCTTCACCGGG 1314
Repeat2b      GCCGCGGTGCGCTCGGTGCGCGGAGAGCCCCACCAAGCTGGCCTTGCTCTTCACCGGG 1314
repeat2c      GC-----CTCGGTGCGCGGAGAGCCCCACCAAGCTGGCCTTGCTCTTCACCGGG 1041
               **               *****

repeat2a      CAGGGCAGCCAGCGACCGGCGATGGGGCGCGGCCTGTACGACGCGTCCCCGCCTTCCGC 1374
Repeat2b      CAGGGCAGCCAGCGACCGGCGATGGGGCGCGGCCTGTACGACGCGTCCCCGCCTTCCGC 1374
repeat2c      CAGGGCAGCCAGCGACCGGCGATGGGGCGCGGCCTGTACGACGCGTCCCCGCCTTCCGC 1101
               *****

repeat2a      GACGCGCTGGATGCCGTGCGGAGCCACTTCGATCGCGAGCTCGATCGCCGCTCCTCGAC 1434
Repeat2b      GACGCGCTGGATGCCGTGCGGAGCCACTTCGATCGCGAGCTCGATCGCCGCTCCTCGAC 1434
repeat2c      GACGCGCTGGATGCCGTGCGGAGCCACTTCGATCGCGAGCTCGATCGCCGCTCCTCGAC 1161
               *****

repeat2a      GTGCTGTTGCCCCCGGTGGCTCCGAGCTGGCCGCTCTGCTCGACGAGACGCTGTTTACC 1494
Repeat2b      GTGCTGTTGCCCCCGGTGGCTCCGAGCTGGCCGCTCTGCTCGACGAGACGCTGTTTACC 1494
repeat2c      GTGCTGTTGCCCCCGGTGGCTCCGAGCTGGCCGCTCTGCTCGACGAGACGCTGTTTACC 1221
               *****
```

```
repeat2a      CAGCCGGCCCTGTTTCGCCCTCGAGGTCGCCCTCTTCCGCCTGGTGAAGCGTGCGGCCTG 1554
Repeat2b      CAGCCGGCCCTGTTTCGCCCTCGAGGTCGCCCTCTTCCGCCTGGTGAAGCGTGCGGCCTG 1554
repeat2c      CAGCCGGCCCTGTTTCGCCCTCGAGGTCGCCCTCTTCCGCCTGGTGAAGCGTGCGGCCTG 1281
*****

repeat2a      CGGCCAGACGCGCTGCTCGGGCACTCGATTGGAGAGCTCGTGGCCGCCACGTTGCCGGC 1614
Repeat2b      CGGCCAGACGCGCTGCTCGGGCACTCGATTGGAGAGCTCGTGGCCGCCACGTTGCCGGC 1614
repeat2c      CGGCCAGACGCGCTGCTCGGGCACTCGATTGGAGAGCTCGTGGCCGCCACGTTGCCGGC 1341
*****

repeat2a      GTGCTCTCGCTCGAGGACGCCTGCACGCTGGTGGCCGCGCGCGCGGCTGATGCACGCG 1674
Repeat2b      GTGCTCTCGCTCGAGGACGCCTGCACGCTGGTGGCCGCGCGCGCGGCTGATGCACGCG 1674
repeat2c      GTGCTCTCGCTCGAGGACGCCTGCACGCTGGTGGCCGCGCGCGCGGCTGATGCACGCG 1401
*****

repeat2a      TTGCCGCCGCGCGACGCCGCGATGGTCGCCCTCAACGCCAGCGAACGCGAGGTGCTCGAC 1734
Repeat2b      TTGCCGCCGCGCGACGCCGCGATGGTCGCCCTCAACGCCAGCGAACGCGAGGTGCTCGAC 1734
repeat2c      TTGCCGCCGCGCGACGCCGCGATGGTCGCCCTCAACGCCAGCGAACGCGAGGTGCTCGAC 1461
*****

repeat2a      GTCCTGTCCGCGCACCCACGGGCGTGGGCATCGCCGCGGTCAACGGCCCGGCCTCCGTG 1794
Repeat2b      GTCCTGTCCGCGCACCCACGGGCGTGGGCATCGCCGCGGTCAACGGCCCGGCCTCCGTG 1794
repeat2c      GTCCTGTCCGCGCACCCACGGGCGTGGGCATCGCCGCGGTCAACGGCCCGGCCTCCGTG 1521
*****

repeat2a      GTGGTCTCCGGCGACGAGGACGCCGTGCTCGCGGTGGCTGCGTCGTTCCAGGCGCGGGG 1854
Repeat2b      GTGGTCTCCGGCGACGAGGACGCCGTGCTCGCGGTGGCCGCGTCGTTCCAGGCGCGGGG 1854
repeat2c      GTGGTCTCCGGCGACGAGGACGCCGTGCTCGCGGTGGCCGCGTCGTTCCAGGCGCGGGG 1581
*****

repeat2a      AGAAAGACCTCGCGGCTGCGCGTCAGCCACGCGTTCCACTCGCATCACATGGACCCGCTG 1914
Repeat2b      AGAAAGACCTCGCGGCTGCGCGTCAGCCACGCGTTCCACTCGCATCACATGGACCCGCTG 1914
repeat2c      AGAAAGACCTCGCGGCTGCGCGTCAGCCACGCGTTCCACTCGCATCACATGGACCCGCTG 1641
*****
```

```
repeat2a      CTGGAGGCGTTCCGGCGCGTGGCCGAGGGGCTCACGTTCCATCCGCCGCGCATCCCCATC 1974
Repeat2b      CTGGAGGCGTTCCGGCGCGTGGCCGAGGGGCTCACGTTCCATCCGCCGCGCATCCCCATC 1974
repeat2c      CTGGAGGCGTTCCGGCGCGTGGCCGAGGGGCTCACGTTCCATCCGCCGCGCATCCCCATC 1701
*****

repeat2a      GTCTCCAACGTACGGGCGCTCGTGCCGAAGAAGGCGAGCTGACCTCCCCCGACTACTGG 2034
Repeat2b      GTCTCCAACGTACGGGCGCTCGTGCCGAAGAAGGCGAGCTGACCTCCCCCGACTACTGG 2034
repeat2c      GTCTCCAACGTACGGGCGCTCGTGCCGAAGAAGGCGAGCTGACCTCCCCCGACTACTGG 1761
*****

repeat2a      GTCCGCCACGTCCGTGGTGCCGTTTCGCTTCGCCGACGGCGTGCAAGCGCTGCGCGCCGAC 2094
Repeat2b      GTCCGCCACGTCCGTGGTGCCGTTTCGCTTCGCCGACGGCGTGCAAGCGCTGCGCGCCGAC 2094
repeat2c      GTCCGCCACGTCCGTGGTGCCGTTTCGCTTTCGCCGACGGCGTGAAAA--GTGCGC-CCGAC 1818
*****      **      *****      **      *****

repeat2a      GGCGTGTCAGCTTCCTCGAGCTCGGCCCCGCACGGCGTGCTCTGCGCCCTCGGGAGCGCC 2154
Repeat2b      GGCGTATCCAGCTTCCTCGAGCTCGGCCCCGCACGGCGTGCTCTGCGCCCTCGGGAGCGCC 2154
repeat2c      GGCGTGTCAGCTTCCTCGAGCTCGGCCCCGCACGGCGTGCTCTGCGCCCTCGGGAGCGCC 1878
*****

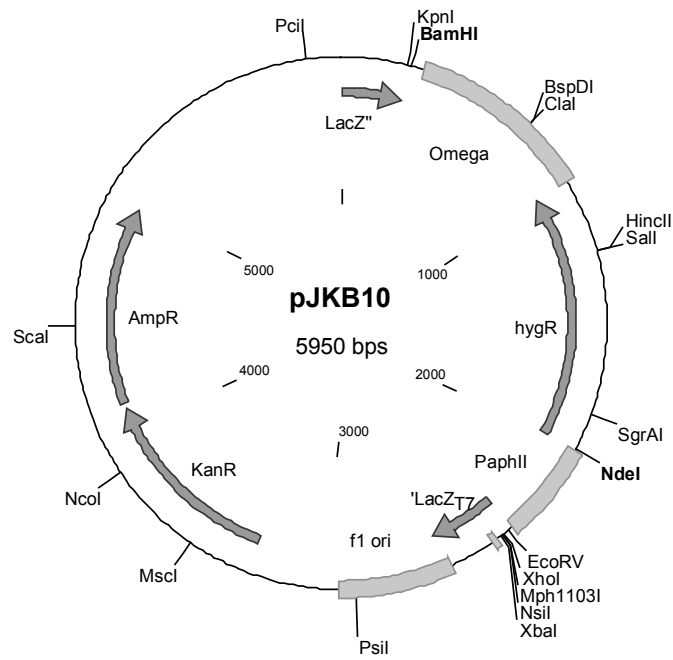
repeat2a      GCGCTCCAGGAGGACCGACCGCCCCCGAGGGCGCCGCCTTCGTGCCCGCCCTCCGCGCC 2214
Repeat2b      GCGCTCCAGGAGGACCGACCGCCCCCGAGGGCGCCGCCTTCGTGCCCGCCCTCCGCGCC 2214
repeat2c      GCGCTCCAGGAGGACCGACCGCCCCCGAGGGCGCCGCCTTCGTGCCCGCCCTCCGCGCC 1938
*****

repeat2a      GAGCGCGCCGACGACGACGCCTTCGCCCGCCCTCGGCGCTCTGTACACCCGCGGGCTC 2274
Repeat2b      GAGCGCGCCGACGACGACGCCTTCGCCCGCCCTCGGCGCTCTGTACACCCGCGGGCTC 2274
repeat2c      GAGCGCGCCGACGACGACGCCTTCGCCCGCCCTCGGCGCTCTGTACACCCGCGGGCTC 1998
*****
```

```
repeat2a    ACCCTCGACTGGCGCGCCCTCTTCGCCCCCTTCGCCCCCTCGCCGCGTCCCCCTTCCCACC 2334
Repeat2b    ACCCTCGACTGGCGCGCCCTCTTCGCCCCCTTCGCCCCCTCGCCGCGTCCCCCTTCCCACC 2334
repeat2c    ACCCTCGACTGGCGCGCCCTCTTCGCCCCCTTCGCCCCCTCGCCGCGTCCCCCTTCCCACC 2058
            *****

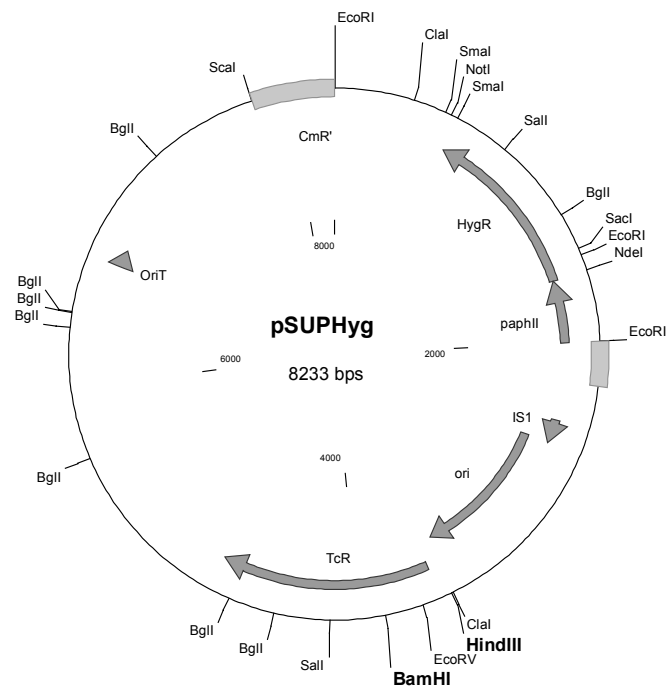
repeat2a    TACGCCTTCCAGCGCGACCGCTTCTGGCTCGAGG----- 2368
Repeat2b    TACGCCTTCCAGCGCGACCGCTTCTGGCTCGACGCCCCCGCGTCCCTCA 2383
repeat2c    TACGCCTTCCAGCGCGACCGCTTCTGGCTCGACGCCCCCGCGTCCCTCG 2107
            ***** *
```

Anhang 1: Sequenzvergleich der Sequenzwiederholungen 2a,2 b und 2c aus dem Spirangienbiosynthesegencluster



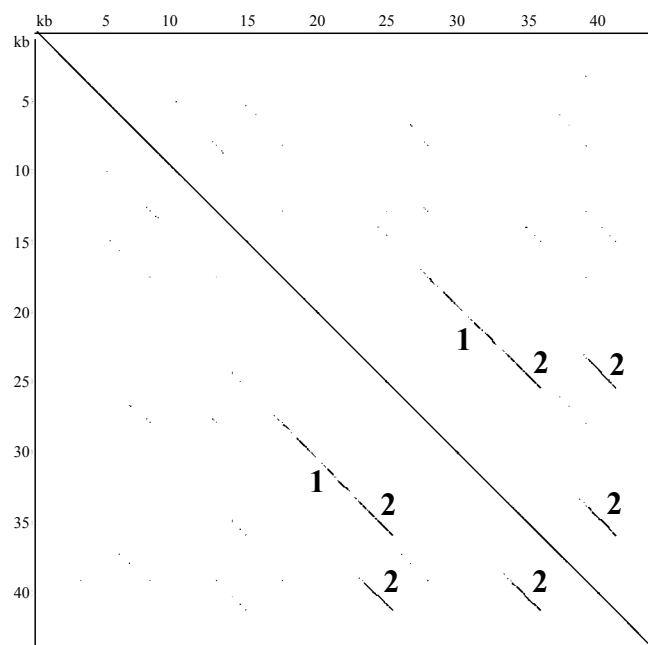
Anhang 2: Karte des Plasmides pJKB10

Gezeigt sind die Lage verschiedener (Resistenz-) Gene und Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. AmpR Ampicillinresistenzgen, KanR Kanamycinresistenzgen, HygR Hygromycinresistenzgen unter Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes Omega Terminator des Omegaelementes



Anhang 3: Karte des mobilisierbaren Plasmides pSUPHyg

Gezeigt sind die Lage verschiedener (Resistenz-) Gene und Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. TcR Tetracyclinresistenzgen, HygR Hygromycinresistenzgen unter Kontrolle des Kanamycinpromotorelementes Cm' zerstörtes Chloramphenicolresistenzgen.



Anhang 4: Dot-blot der A7-Sequenz mit den Bereichen 1 und 2 der Sequenzwiederholungen.